



## Universidad Pablo de Olavide

**Don Vicente Carlos Guzmán Fluja, Rector Magnífico de la Universidad Pablo de Olavide, de Sevilla,**

### **CERTIFICA:**

**Que Don Pedro Jesús García Murillo**, nacido el día 29 de diciembre de 1991 en Sevilla, de nacionalidad Española, con NIF número **28834450V**, ha superado en esta Universidad, con fecha **04 de julio de 2017**, los estudios conducentes al Título Oficial de **MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA SANITARIA POR LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE**, establecido por Acuerdo del Consejo de Ministros de 12 de marzo de 2010, nº de registro nacional **2017249170**, con validez en todo el territorio nacional, que faculta al interesado para disfrutar los derechos que a este título otorgan las disposiciones vigentes. Abonados los derechos para la expedición del mencionado título con fecha **08 de agosto de 2017**.

Y para que surta los mismos efectos del título, con carácter provisional hasta que éste se expida, libro la presente certificación en Sevilla, a 04 de octubre de 2017.

*Esta Certificación Supletoria tiene validez por un año (R.D. 22/2015 de 23 de enero)*

Código Seguro de verificación:AST9/5SceEepPfovZ8daVw==. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección: <https://portafirmas.upo.es/verificarfirma>  
Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.

FIRMADO POR	VICENTE CARLOS GUZMAN FLUJA		FECHA	11/10/2017
ID. FIRMA	firma.upo.es	AST9/5SceEepPfovZ8daVw==	PÁGINA	1/1



AST9/5SceEepPfovZ8daVw==

# **Estudio de la función de Myf5 en el desarrollo de la musculatura de las extremidades**

Pedro Jesús García Murillo

2016/2017

Tutor externo: Jaime J. Carvajal

Tutor interno: Antonio J. Pérez Pulido

Instrucciones para autores de la revista Development:

<http://dev.biologists.org/content/manuscript-prep>



**PALABRAS CLAVES:** Development, Limb, Myf5, Myogenesis, Skeletal Muscle, Transcription

## ABSTRACT

Skeletal myogenesis in vertebrates is coordinated by the activation of a cascade of the four Myogenic Regulatory Factors (MRFs): Myf5, Mrf4, MyoD and MyoG. These transcription factors bind DNA and activate the expression of specific genes in particular progenitor cells that will give rise to the different muscles in the adult body. The MRFs' cascade is initiated by Myf5, the first factor to be expressed in the embryo. We and others have extensively studied the complex transcriptional regulation of the *Myf5/Mrf4* locus using transgenic mice. Nowadays, we know that there are more than 25 regulatory elements controlling the expression of *Mrf4* and *Myf5* in a specific time frame and in particular embryonic progenitors.

One of these regulatory elements is a limb enhancer located 57 kb upstream of the *Myf5* transcriptional start site. This enhancer controls *Myf5* expression in limbs during development. While the mechanisms involved in the spatiotemporal regulation of *Myf5* have been extensively studied at both single-enhancer and global regulatory levels, the function of Myf5 in different subpopulations of muscle progenitor cells is still not explored.

This project focuses on the generation and initial characterization of new alleles to study Myf5 function: a line in which the limb enhancer has been removed from the genome by CRISPR/Cas9, a line in which a FLAG tag has been fused with the Myf5 gene and some novel mutant lines with a functional deletion of Myf5, in which no surrounding enhancer has been removed.

## INTRODUCCIÓN

Durante la etapa de desarrollo embrionario, tras la formación de la blástula, se produce la gastrulación, proceso que da lugar a las capas fundamentales del embrión: el ectodermo, que dará lugar a la epidermis, las estructuras asociadas a los pelos y las

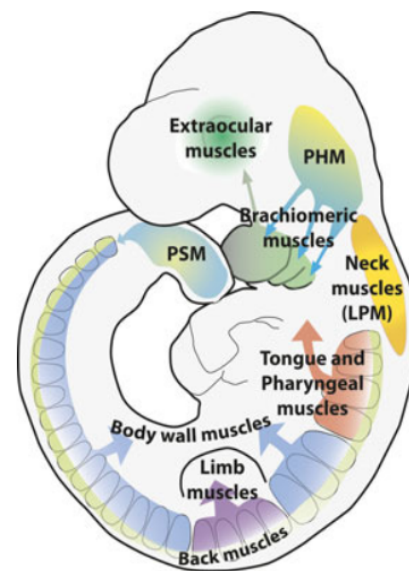
uñas y el sistema nervioso; el endodermo, desde el que se formará el sistema respiratorio, el sistema digestivo y las glándulas anexas; y entre ambos, el mesodermo, el cual es el responsable de la formación del sistema reproductor, el sistema excretor, el sistema circulatorio,

los huesos y los músculos (Wolpert et al., 1992, Gilbert, 2003).

Dentro del mesodermo distinguimos cuatro poblaciones de progenitores celulares mesodérmicos a través del eje mediolateral (Fig. 1). En primer lugar, nos encontramos el cordamesodermo, encargado de inducir la formación del tubo neural y de establecer el eje anteroposterior. A continuación, tenemos el mesodermo pre-somítico (del inglés, PSM), constituido por bloques de células mesodérmicas situadas a ambos lados del tubo neural, los somitas, los cuales darán origen a las células que forman las vértebras y las costillas, la dermis de la piel dorsal, los músculos esqueléticos de la espalda y los músculos esqueléticos de la pared corporal y de las extremidades. (Gilbert, 2003, Cossu and Borello, 1999). Las otras dos poblaciones de progenitores mesodérmicos son el mesodermo intermedio, que formará el sistema urogenital, y la placa del mesodermo lateral (del inglés, LPM), que contribuye a la formación de algunos músculos de la masticación, la musculatura del cuello, el corazón y los vasos y células sanguíneas. Por otro lado, en la posición anterior al mesodermo del tronco, encontramos una quinta región mesodérmica, el mesodermo precordial o mesodermo cefálico, que podemos diferenciar en anterior y posterior (del inglés, PHM). Estos darán lugar a los

músculos extraoculares y a los músculos faciales (de expresión y de masticación), respectivamente (Gilbert, 2003, Moncaut et al., 2013).

Los músculos de las extremidades se forman a partir de los somitas del PSM, los cuales brotan desde el extremo rostral hacia atrás, a partir de un somita



**Figura 1. Origen de los distintos músculos esqueléticos.** Representación gráfica de las principales poblaciones de progenitores mesodérmicos dónde se muestran los somitas que darán lugar a las diferentes poblaciones musculares del individuo adulto (Moncaut et al., 2013).

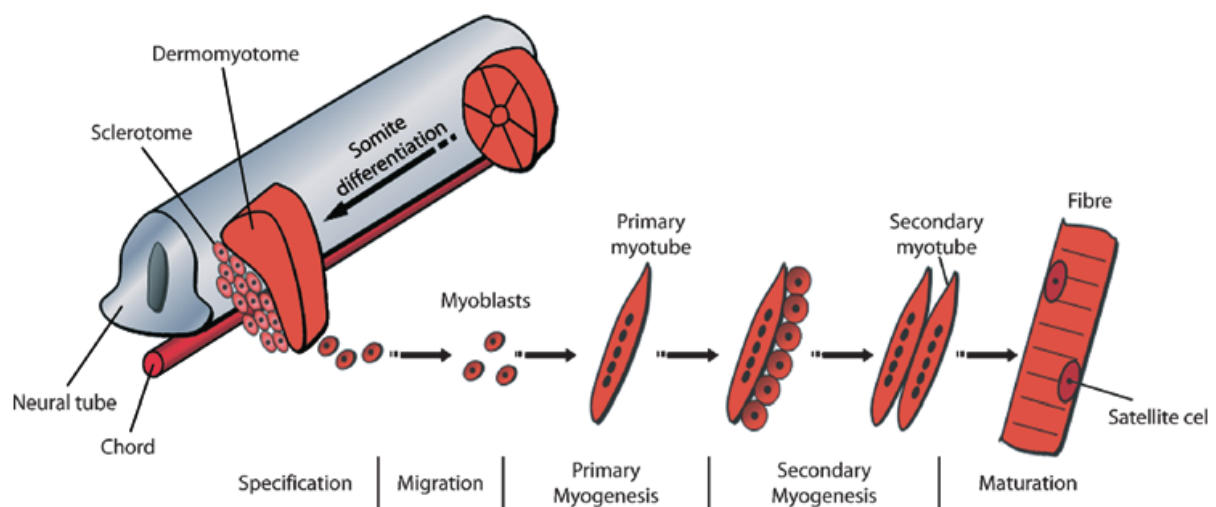
que se forma en la porción anterior del tronco. Podemos dividir a los somitas en tres regiones; el esclerotomo, que formará las células cartilaginosas de las vértebras y parte de cada costilla, el dermatomo, la

región formadora de la dermis, y el miotomo, que es el responsable de la formación de las fibras musculares, y que junto al dermatomo forma el dermomiotomo (Fig. 2) (Charrasse et al., 2003, Gilbert, 2003).

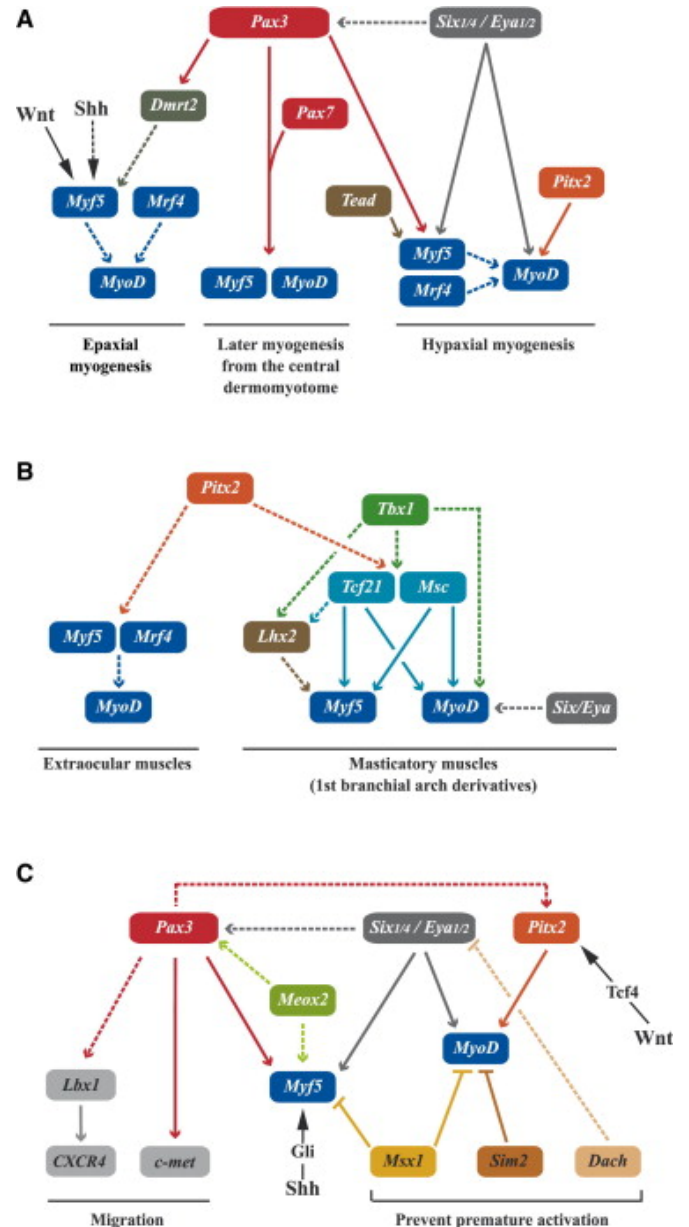
La miogénesis se inicia como respuesta a numerosas proteínas de señalización producidas por el tubo neural, la notocorda y el ectodermo dorsal (Rudnicki and Williams, 2015), entre las que se incluyen activadores como Sonic hedgehog (Shh), Wnts o Noggin, y posibles inhibidores como BMP4 (Cossu and Borello, 1999). Estas señales provocan la determinación de las células del miotomo en la cual participan una serie de componentes de la vía miogénica.

En vertebrados, todas las células

progenitoras miogénicas comparten un mismo conjunto de estos componentes, específicos de músculo, encargados de iniciar y coordinar el desarrollo de los primeros músculos esqueléticos, formado por los cuatro Factores de Regulación Miogénicos (del inglés, MRFs): Myf5, Mrf4, MyoD y MyoG (Tajbakhsh et al., 1996, Arnold and Braun, 2000). Los MRFs son proteínas pertenecientes a la superfamilia de factores de transcripción hélice-bucle-hélice (del inglés, bHLH) que se unen al ADN en el dominio E-box caracterizado por la secuencia CANNTG, activando genes específicos de músculo e induciendo la



**Figura 2. Representación esquemática de la diferenciación de los somitas y formación del músculo esquelético.** Tras la determinación de las células del miotomo, los mioblastos comienzan a dividirse hasta agotarse los Factores de Crecimiento Fibroblásticos (del inglés, FGF), y es entonces cuando los mioblastos detienen su división, se alinean formando cadenas y se fusionan en miotubos que posteriormente darán lugar



a las fibras musculares. Modificado de Charrasse et al., 2003.

conversión miogénica (Fig. 3) (Buckingham and Rigby, 2014, Wu and Rastinejad, 2017).

Diferentes estudios han demostrado que *Myf5* es el primero de estos 4 genes en ser expresado, y que es el encargado de

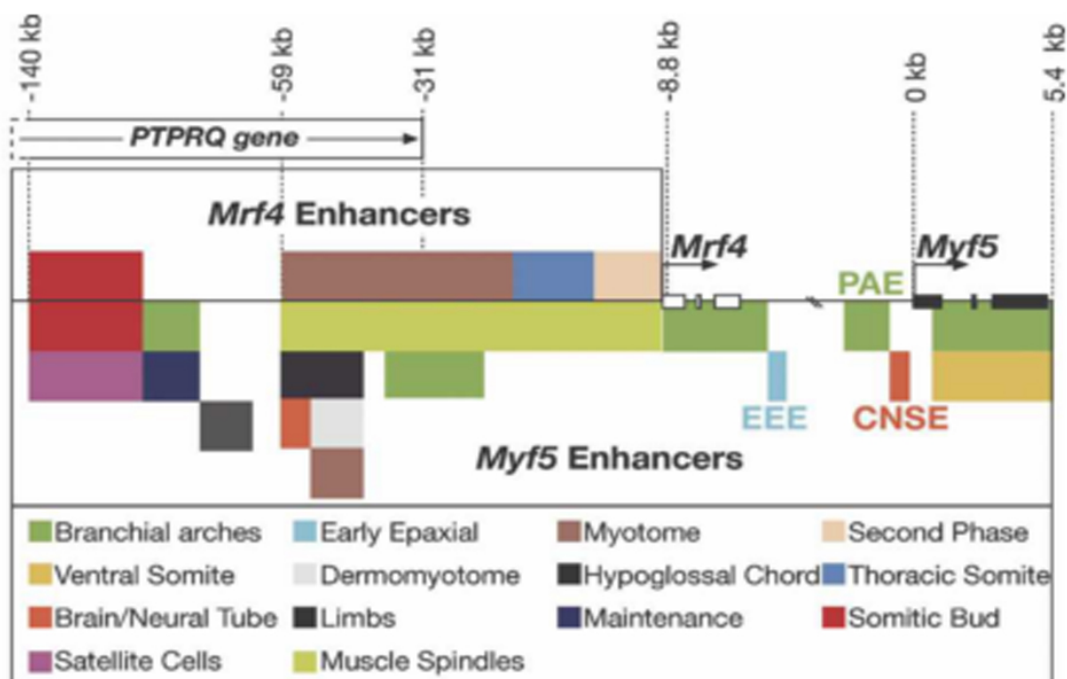
iniciar y coordinar la cascada miogénica (Arnold and Braun, 2000), por lo que conocer cómo se inicia y se mantiene su expresión es un punto clave para comprender los mecanismos de la miogénesis. En ratón, esto tiene lugar en

el tronco a los 8,0 días *post-coitum* (dpc), seguido de *MyoG* a los 8,5 dpc, *Mrf4* a los 9,0 dpc y finalmente *MyoD* a los 10,5 dpc. Estos 4 componentes forman un núcleo funcional común para el proceso de generación del músculo esquelético en las distintas zonas del organismo, aunque el tiempo en el que se expresa cada uno varía de una población muscular a otra. Por ejemplo, en el caso de las extremidades, *Myf5* sigue siendo el primero de los MRFs expresados, a los 10,5 dpc, pero en esta ocasión lo hace al mismo tiempo que *MyoD*, seguido de la expresión de *MyoG* a partir de 11,5 dpc y finalmente *Mrf4* a 13,5 dpc (Biressi et al., 2007, Kassari-Duchossoy et al., 2005, Ott

et al., 1991). Esto se debe a que los activadores de la cascada y el despliegue de los diferentes miembros del núcleo MRF varían dependiendo del origen mesodérmico de las células dando lugar a

**Figura 3. Representación esquemática de las redes de regulación génica que dirigen la miogénesis.** Redes de regulación encargadas de controlar los procesos de determinación y diferenciación del músculo esquelético en el tronco (A), cabeza (B) y extremidades (C) (Buckingham and Rigby, 2014).

los diferentes grupos musculares, y a la participación de diversos elementos reguladores en este proceso (Fig. 4).





**Figura 4. Mapa de las secuencias reguladoras del locus *Mrf4/Myf5*.** Esquema del *locus Mrf4/Myf5* dónde las secuencias reguladoras de *Mrf4* se encuentran en la parte superior de la figura y las de *Myf5*, en la parte inferior. Modificado de Carvajal et al., 2008.

Cuanto más arriba nos encontramos en la cascada miogénica, mayor complejidad podemos encontrar en la red de elementos reguladores, por lo que *Myf5*, al ser el responsable de que se inicie dicha cascada, es el componente que se encuentra conectado a un mayor número de vías de señalización (Carvajal and Rigby, 2010).

A diferencia de otros elementos de la cascada miogénica, como *MyoG* o *MyoD*, *Myf5* está regulado por más de 17 regiones reguladoras que controlan su expresión espacio-temporal (Summerbell et al., 2000, Carvajal et al., 2001). La expresión de *Myf5* en el desarrollo de las extremidades necesita de al menos tres de estos elementos reguladores, de los cuales, dos de ellos modulan la función del elemento regulador principal de la extremidad que se encuentra localizado en el intervalo -57,5 kb a -57,0 kb. Este elemento principal (del inglés, *Limb Core Enhancer*) es esencial para la activación de la expresión de *Myf5* desde los 10,5 a los 14,5 dpc, y su eliminación en transgénesis elimina por completo la expresión de *Myf5* en las extremidades (Hadchouel et al., 2003).

Partiendo de este conocimiento, hemos querido estudiar los elementos que interaccionan con *Myf5* para que se produzca el inicio del proceso de miogénesis, concretamente en la formación del músculo esquelético de las extremidades, los cuales no son muy conocidos. Para ello, se ha generado una nueva línea mutante en la que el Limb Core Enhancer de *Myf5* ha sido deletado mediante el uso de tecnologías CRISPR/Cas9.

Por otro lado, al no existir anticuerpos específicos contra *Myf5* con los que poder estudiar sus sitios de unión a ADN durante la embriogénesis, estamos diseñando una línea de ratón que exprese la proteína de fusión FLAG-*Myf5*. FLAG es una etiqueta polipeptídica de secuencia Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, frente a la cual pueden utilizarse anticuerpos específicos (Hopp et al., 1988). Durante la elaboración de dicha línea mutante, de manera paralela hemos generado ratones fundadores que carecen del FLAG pero que presentan delecciones funcionales de *Myf5*. De este modo, se pueden obtener nuevos alelos knock out (KO) para *Myf5* que no alteren

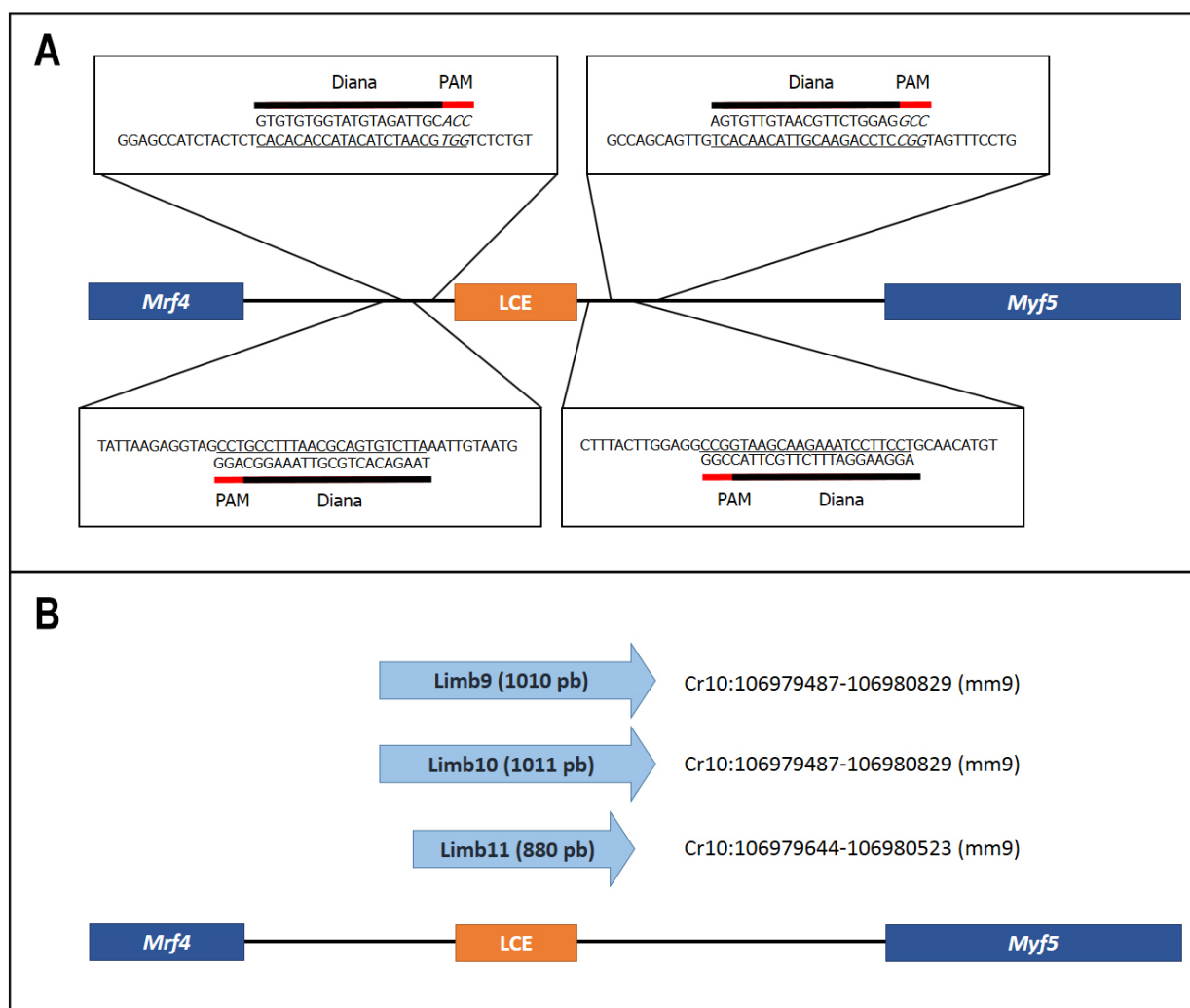
la función de ninguno de los elementos reguladores del *locus* de *Mrf4/Myf5* (Carvajal et al., 2008), lo cual mejoraría los alelos *Myf5*-KO existentes en la actualidad, ya que permitiría mayor conocimiento sobre la función de *Myf5* durante la miogénesis.

## RESULTADOS

### 1. Generación del KO del Core Enhancer de *Myf5* en las extremidades mediante CRISPR

Para comprobar que elementos interaccionan con *Myf5* durante el desarrollo del músculo esquelético de las extremidades, se realizó inicialmente un

KO del Limb Core Enhancer, elemento que se encuentra localizado dentro del *locus Mrf4/Myf5*, en el intervalo -57,5 kb a -57,0 kb y el cual es esencial para la activación de la expresión de *Myf5* durante la miogénesis. Dicha línea mutante fue obtenida a partir de la tecnología CRISPR/Cas9, herramienta empleada para editar el genoma de cualquier célula de manera dirigida (Sternberg et al., 2014). Para ello se diseñaron 2 pares de guías para el Limb Core Enhancer, de manera que aumentara la eficiencia del CRISPR y disminuyeran las dianas inespecíficas (Fig. 5A). Estas guías se inyectaron en una hembra de ratón silvestre y se



**Figura 5. Guías para CRISPR y delecciones generadas del Limb Core Enhancer (LCE).** (A) Secuencias de los 2 pares de guías utilizadas para la generación del KO del Limb Core Enhancer, en la que se indica la secuencia PAM, esencial para el reconocimiento por el complejo CRISPR/Cas9. (B) Representación de las principales delecciones generadas, mediante flechas azules, y las coordenadas de las mismas (Cromosoma:Base Inicial-Base Final). En todos los casos se utilizó el ensamblaje de ratón mm9.

obtuvieron 11 ratones, 2 silvestres y 9 que presentaban delecciones. Tras la secuenciación de los 9 ratones fundadores, se observó que 3 de las delecciones eran muy parecidas, Limb9, Limb10 y Limb11 (Fig. 5B). Finalmente se decidió establecer una línea utilizando el macho que presentaba la delección más

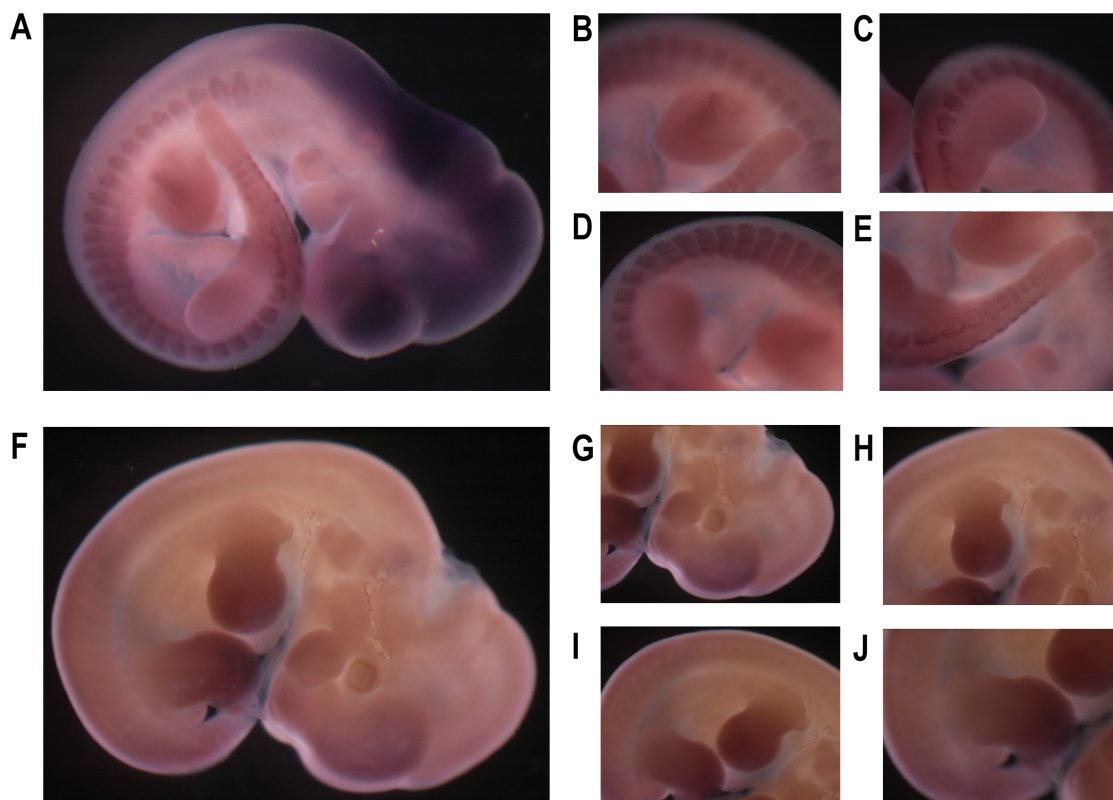
corta que incluía el Limb Core Enhancer completo, Limb11. Los animales F0 provenientes de CRISPR/Cas9 son generalmente mosaicos y por lo tanto este macho se cruzó con una hembra silvestre para separar los posibles alelos. De la F1 de este cruce, se obtuvieron un macho y una hembra con la misma

mutación, que se usaron para establecer finalmente la línea mutante Limb11.

## 2. Puesta a punto de diversos marcadores expresados en las extremidades durante el desarrollo

Durante el tiempo transcurrido hasta obtener todos los embriones silvestres y de la línea Limb11 en el estadio de 11,5 dpc que necesitábamos para este Trabajo Fin de Máster, realizamos distintas sondas de ARN; tanto del Factor de

Regulación Miogénico (del inglés, MRF), *Myf5*, como de los genes *Tbx18*, *Hoxc12* y *Tcf3*, de los cuales se sabe que están relacionados con el proceso de miogénesis (Alvarado et al., 2016; Buchberger et al., 2007; King et al., 2006). Posteriormente probamos las sondas de *Myf5* y *Tbx18* mediante hibridación *in situ* (del inglés, *ISH*) (Jensen et al., 2014) en embriones de distintos estadios, al tiempo que pusimos a punto dicha técnica (Fig. 6).



**Figura 6. Imágenes de ISH con sondas de genes relacionados con la miogénesis.** Capturas de las distintas hibridaciones *in situ* realizadas para la prueba de sondas de ARN. (A-E) Prueba de la sonda de *Myf5* en (A) embrión completo silvestre de 10,0 dpc dónde se ve expresión en (B) extremidad anterior y (C) posterior, (D) somitas y (E) cola. (F-J) Prueba de la sonda de *Tbx18* en (F) embrión completo silvestre de 11,0 dpc, mostrando expresión en (G) cabeza, (H) extremidad anterior y (J) posterior y (I) levemente en los somitas.

### 3. Análisis de los nuevos alelos

Mediante el uso de experimentos de transgénesis utilizando cromosomas artificiales de bacteria, ya se había demostrado que el Limb Core Enhancer es esencial para dirigir la expresión del gen *Myf5* en las extremidades anteriores y posteriores desde el día 10,5 dpc (Hadchouel et al., 2003). Sin embargo, esta es la primera vez que se elimina este elemento regulador del genoma, eliminando por tanto la función de *Myf5* en los progenitores musculares de las extremidades. Para determinar cuál es el efecto de este KO específico en estos progenitores, y para comprender qué genes activa o inactiva este factor de transcripción, se han utilizado análisis transcriptómicos de microarray.

#### 3.1. Estudio de la expresión diferencial de genes entre el KO del Limb Core Enhancer de *Myf5* y el silvestre mediante microarray

Para obtener las muestras necesarias para la realización del microarray con el que estudiar el efecto a nivel genético de la delección del Limb Core Enhancer de *Myf5*, extrajimos 24 embriones de 11,5 dpc: 12 de ratones Limb11 y otros 12 de ratones silvestres del mismo fondo genético (CD-1). Después seccionamos

sus extremidades delanteras y utilizamos 4 pares para cada una de las 3 réplicas biológicas de cada línea. Realizamos la extracción de ARN de las muestras y las mandamos a la Unidad de Genómica del CABIMER (Sevilla, España) para hibridar un microarray de expresión.

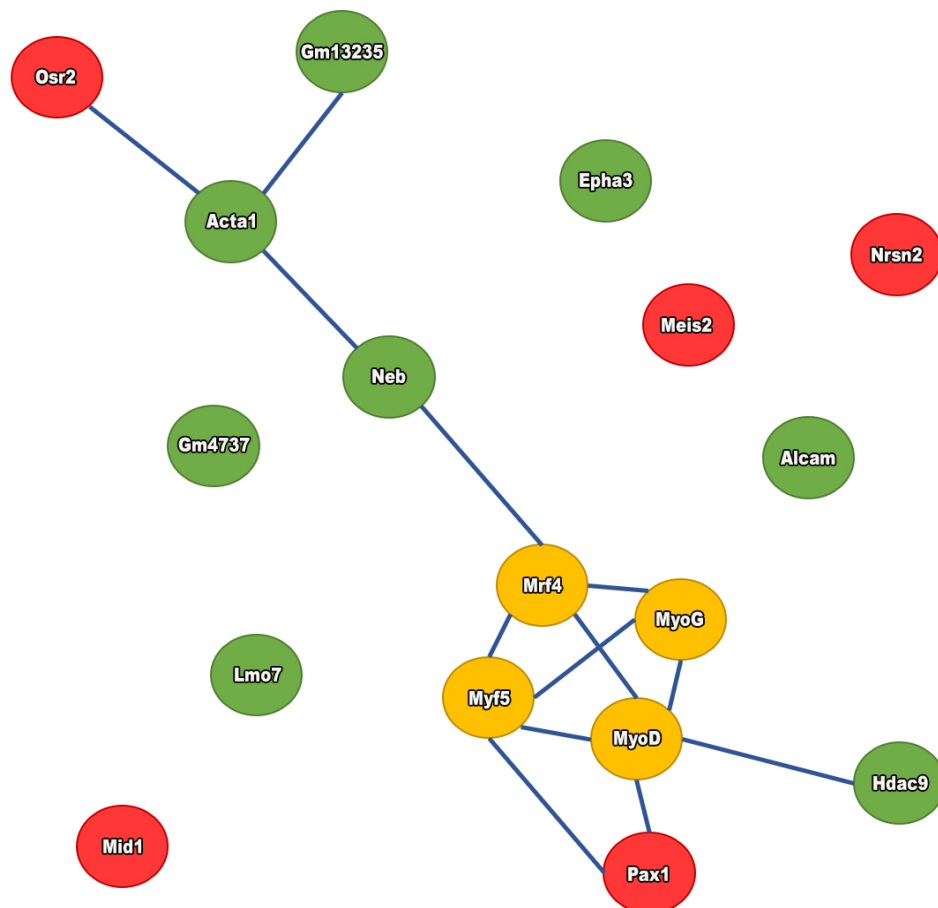
Con un fold change mayor a 1,5 o menor a -1,5, y un p-value menor a 0,5, obtuvimos 16 genes diferencial (por los valores de fold change) y significativamente (como consecuencia de los valores de p-value) expresados (Tabla 1).

**Tabla 1. Genes cuya expresión está más significativamente alterados en embriones de la línea Limb11.** En esta tabla se indican los genes más destacables de los resultados del microarray en base de su fold change y su p-value, también indicados. En fondo azul se representan los genes cuya expresión disminuye en la línea Limb11 y en rojo, aquellos que se sobreexpresan en el KO.

Genes	Fold Change	p-value	Genes	Fold Change	p-value
Gm4737	-2,79	0,43	Nrsn2	1,52	0,43
Neb	-2,24	0,43	Gm25783	1,52	0,43
Acta1	-2,02	0,43	Osr2	1,53	0,43
Epha3	-1,83	0,43	Pax1	1,54	0,43
Gm13235	-1,81	0,43	Gm25382	1,65	0,43
Hdac9	-1,62	0,43	Mid1	2,04	0,44
Alcam	-1,53	0,44	Meis2	2,25	0,43
Lmo7	-1,52	0,43	Gm22771	13,54	0,43

Para comprobar las relaciones entre estos genes y si participan en rutas específicas, se analizaron con la base de datos STRING, la cual contiene información sobre redes de interacción de proteínas.

En este análisis decidimos incluir también los cuatro Factores de Regulación Miogénicos (del inglés, MRFs); *Myf5*, *Mrf4*, *MyoG* y *MyoD* para seleccionar posteriormente aquellos genes que



**Figura 7. Esquema de las redes de asociación de proteínas.** Representación de las conexiones entre las proteínas codificadas por los genes que presentan mayor diferencia y significancia estadística en su expresión entre la línea silvestre y Limb11 y su relación con los MRFs. En ella se indican en verde los genes cuya expresión disminuye en la línea mutante, en rojo aquellos que se sobreexpresan en el KO y en amarillo los 4 MRFs.

tenían una relación con ellos (Fig. 7). A partir de los datos generados mediante la base de datos STRING, decidimos

seleccionar y estudiar aquellos genes que se encontraban relacionados de manera directa con los

**Tabla 2. Análisis de los genes más significativos obtenidos por microarray.** Estudio de los genes más relevantes diferencialmente expresados en las extremidades delanteras de ratones silvestres y Limb11 de 11,5 dpc. En fondo azul se representan los genes cuya expresión disminuye en la línea Limb11 y en rojo, aquellos que se sobreexpresan en el KO.

Gen	Lugar de expresión	Fenotipo por delección
Neb	Mesénquima embrionario	Contractilidad reducida del músculo esquelético y debilidad muscular progresiva.
Acta1	Mesénquima embrionario, músculo esquelético, extremidades	Escoliosis, debilidad muscular, tamaño y peso corporal reducidos
Hdac9	Mesénquima embrionario, músculo esquelético	Hipertrofia cardíaca dependiente de la edad
Pax1	Endodermo y mesénquima embrionarios, músculo esquelético, extremidades	Defectos en la columna vertebral
Osr2	Mesénquima embrionario, músculo esquelético, extremidades	Letalidad neonatal, hendidura del paladar secundario y anillos tímpanos engrosados

MRFs, y en especial, con *Myf5* (Tabla 2). Por ese motivo, y teniendo en cuenta el tiempo para el que se disponía para este Trabajo Fin de Máster, decidimos centrarnos en el gen *Pax1*.

### 3.2. Validación de los resultados para el gen *Pax1*

Para validar los datos obtenidos a partir del microarray, decidimos realizar hibridación *in situ* (del inglés, ISH) y PCR cuantitativa (del inglés, qPCR) a partir de sondas de ARN de los genes diferencialmente expresados. Para este Trabajo de Fin de Master, sólo se ha

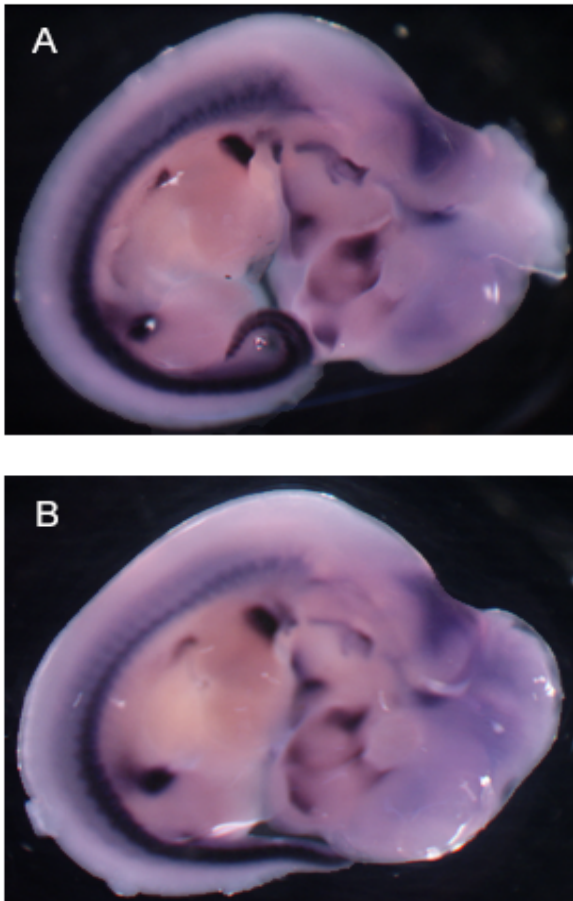
analizado el gen *Pax1*, un factor de transcripción de la familia de genes Pax (del inglés, paired box) relacionados con el desarrollo del esqueleto de vertebrados (Blake and Ziman, 2014). Se seleccionó este gen en particular porque es el único de la lista que se ha relacionado directamente con *Myf5* con anterioridad (Macarena López y Jaime Carvajal, artículo en preparación).

#### 3.2.1 Estudio de la expresión de *Pax1* mediante hibridación *in situ*

Para validar los resultados obtenidos por microarray del gen *Pax1*, realizamos



hibridación *in situ* de embriones de 11,5 dpc, tanto silvestres como de la línea mutante Limb11, utilizando una sonda de ARN de *Pax1* en los cuales no se apreció ningún cambio en la expresión (Fig. 8).



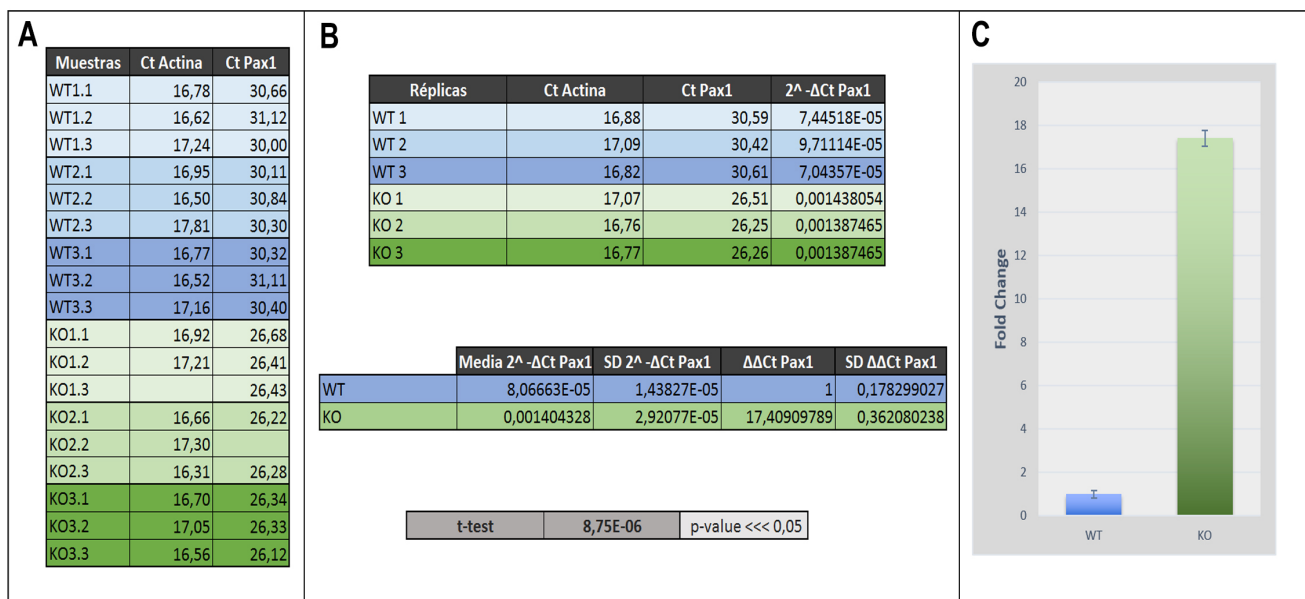
**Figura 8. IHS de embriones de 11,5 dpc con la sonda *Pax1*.** Embriones completos (A) de la línea mutante Limb11 y (B) de una línea silvestre a los cuales se les ha realizado una ISH con la sonda de ARN de *Pax1*. En ellas se puede observar expresión principalmente en somitas y en la región proximal de las extremidades.

Por este motivo, realizamos secciones de las extremidades para ver si podíamos detectar alguna diferencia en la expresión que no podamos ver en la hibridación *in situ* del embrión completo. Sin embargo no hemos podido observar ninguna diferencia de patrón de expresión ni en niveles de intensidad.

### 2.3. Estudio de la expresión de *Pax1* mediante PCR cuantitativa (qPCR)

A partir de los datos extraídos de la ISH, decidimos realizar una qPCR con las muestras usadas para el microarray, para así complementar y validar resultados obtenidos en ambos ensayos. La qPCR es una técnica parecida a la PCR estándar, con la diferencia de que la cantidad de producto de PCR en este caso se mide después de cada ciclo de amplificación, gracias a un marcador fluorescente, en lugar de al final de la amplificación. La señal de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN amplificado en un ciclo y el ciclo en el cual se detecta fluorescencia por primera vez se denomina ciclo umbral (del inglés, Ct) (Higuchi et al., 1993).





**Figura 9. Análisis de los datos obtenidos por qPCR.** (A) Tabla de valores de Ct obtenidos de las distintas réplicas biológicas y técnicas tanto de la línea silvestre (WT) como de la línea mutante (KO). (B) Análisis de los datos obtenidos de la qPCR por el cual se normalizan los valores de *Pax1* con los datos de *Actina*. (C) Representación gráfica de la diferencia de expresión producida entre el WT y el KO (p-value <<< 0,5).

En este caso, utilizamos cebadores específicos para *Pax1* y cebadores específicos para *Actina*, con la que poder normalizar los resultados que obtuviéramos, y 3 réplicas técnicas para cada una de nuestras muestras para incrementar la potencia estadística del análisis. (Fig. 9).

Tras normalizar los resultados y comparar los valores de ciclo umbral de ambas muestras, podemos ver que la Ct normalizada de *Pax1* en el mutante es menor que en el silvestre, lo que indica una vez más que la expresión de *Pax1* en las extremidades en ausencia de este Core Enhancer es mayor que en la línea

silvestre, con un fold change de 17,41. Este resultado de qPCR por tanto valida el resultado del microarray. La discrepancia aparente entre estos resultados y aquellos de la ISH pueden ser debidos a que el patrón de expresión embrionario no está alterado, sólo los niveles, y al ser la ISH una técnica no cuantitativa, no podemos detectar estos cambios. Nuevas ISH con cantidades limitantes de sonda podrían resolver esta cuestión.

### 3. Generación de una línea FLAG-Myf5

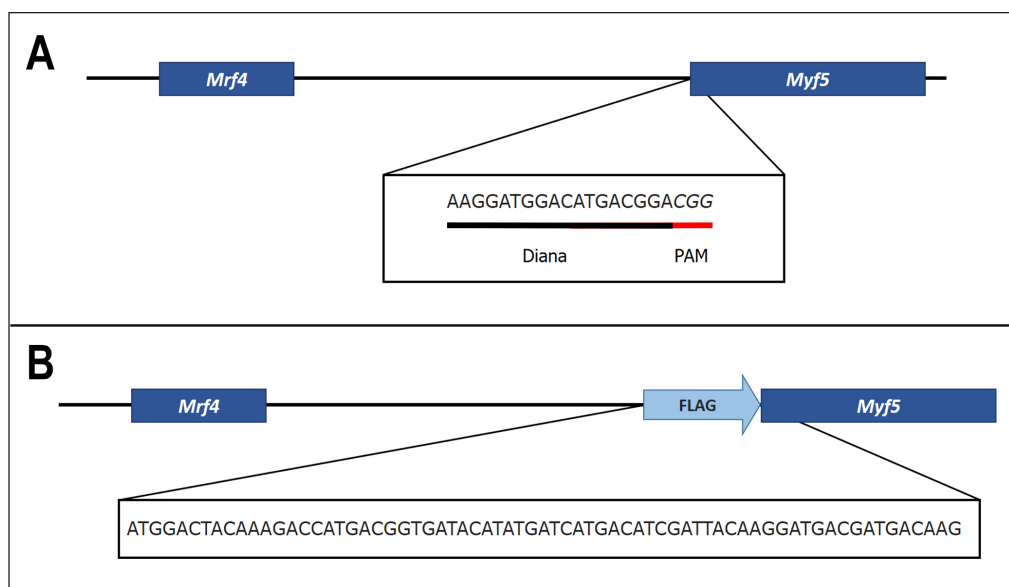
#### 3.1. Estrategia general

Para la generación de la línea FLAG-Myf5 mediante la técnica de CRISPR/Cas9, se diseñó una guía de ARN de tal forma que se encontrara lo más cerca posible al codón ATG de *Myf5* la cual, mediante microinyección, se introdujo en el pronúcleo de embriones de ratón de 0.5 dpc junto con ARNm codificante para Cas9 y una cadena simple de ADN molde que contenía dos regiones de homología flanqueando a la secuencia del FLAG (Fig. 10). De esta manera, esperábamos obtener por un lado una línea mutante en la que la secuencia del FLAG se hubiera insertado mediante recombinación homóloga en fase con la secuencia *Myf5* e individuos que presentaran alguna delección de *Myf5* debido mecanismos de reparación de ADN no ligados a recombinación homóloga (deleciones al azar).

## 3.2. Búsqueda de fundadores

### 3.2.1. FLAG-Myf5

Para la búsqueda de fundadores de la línea FLAG-Myf5, se tomaron biopsias de 20 animales de las dos camadas obtenidas por microinyección de la secuencia del FLAG mediante la técnica de CRISPR/Cas9. Después de analizar dichas muestras mediante una PCR en la que usamos cebadores específicos del FLAG, encontramos un individuo que



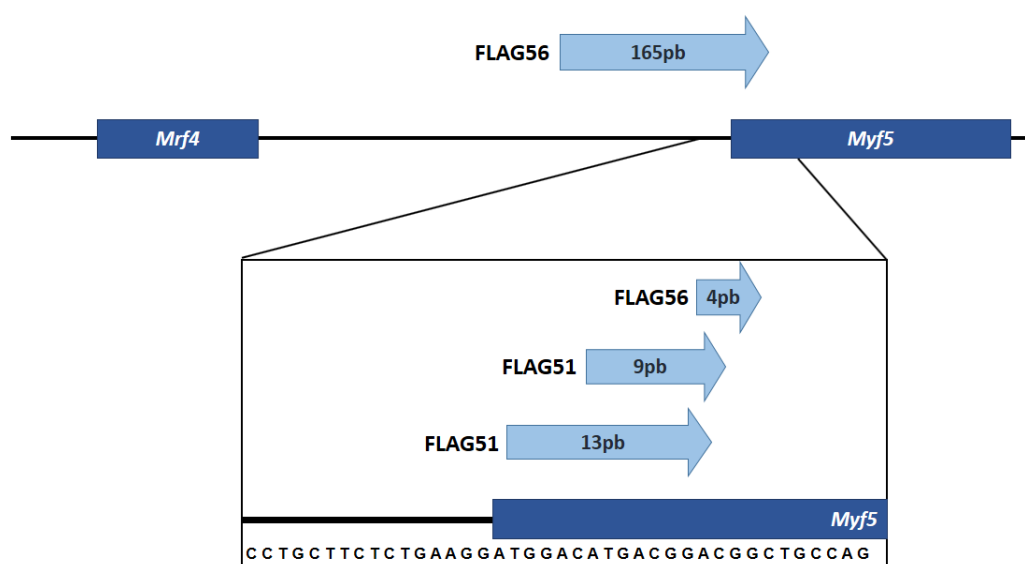
**Figura 10. Guía para CRISPR y secuencia del FLAG.** (A) Secuencia de la guía empleada para la generación de las líneas FLAG-Myf5 y Myf5-KO. (B) Representación del lugar de inserción del FLAG, mediante una flecha azul, así como su secuencia.

podía haber insertado el FLAG en fase con *Myf5*, al cual denominamos FLAG49 (Fig. 12A), y pusimos dicho individuo en cruces con una hembra silvestre. Al genotipar la camada resultante de dicho cruce, no solo vimos que ninguno de ellos presentaba el FLAG (Fig. 12B), sino que la muestra que utilizamos como control positivo, FLAG49, parecía que tampoco. Tras volver a genotipar con cebadores específicos comprobamos que se trataba de un falso positivo, por lo que será necesario que sigamos repitiendo la microinyección en nuevos embriones para lograr un fundador de esta línea.

fundadores de nuevas líneas Myf5-KO, tratamos las muestras de una de las camadas que habíamos utilizado en la búsqueda de fundadores de la línea FLAG-Myf5 con la endonucleasa T7, la cual reconoce y escinde ADN mal emparejado. Esto nos permitió distinguir 2 posibles positivos para indels (pequeñas inserciones o deleciones en el genoma), ya que

### 3.2.2. Líneas Myf5-KO

Un subproducto de la generación de la línea FLAG-Myf5 es la generación de mutantes para *Myf5*. Para la búsqueda de

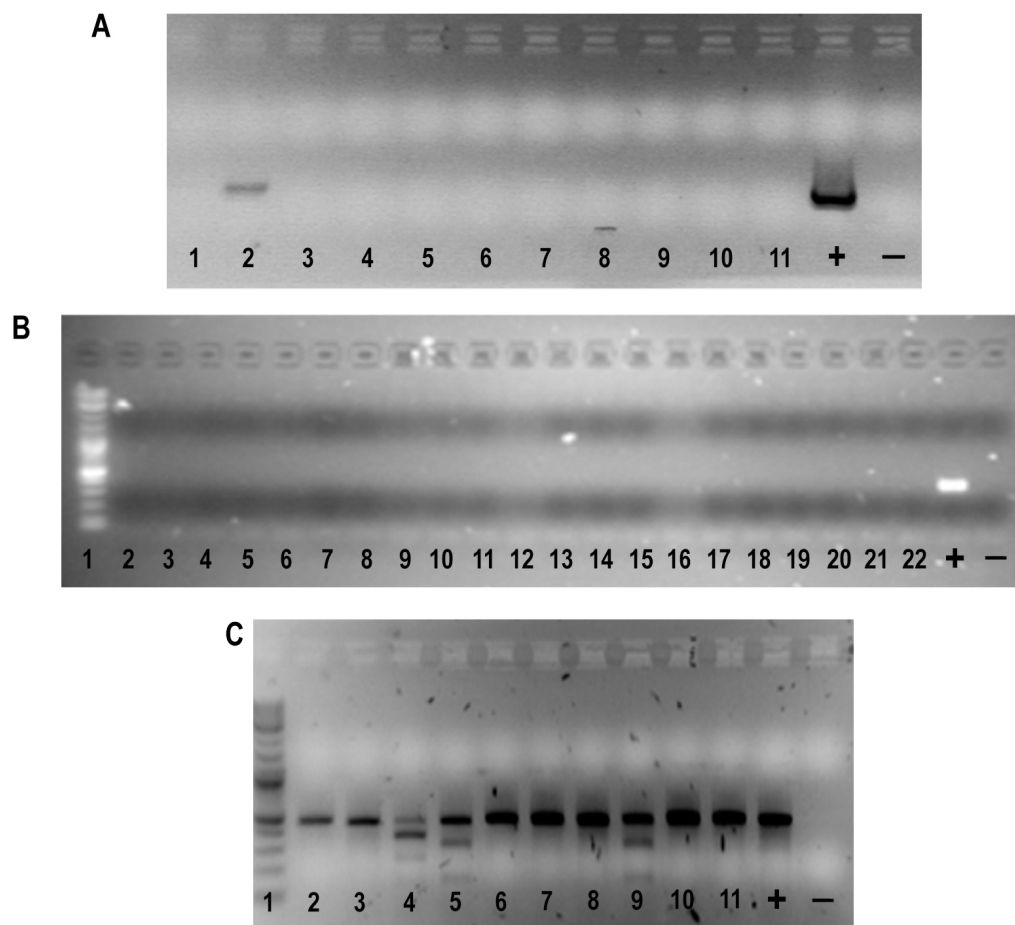


presentaban bandas con distintos tamaños a las de la muestra silvestre y que además no presentaban los tamaños esperados para la secuencia del FLAG (295 pb y 157 pb), teniendo en cuenta los cebadores empleados (-295F y +157R). Estos dos ratones fundadores los denominamos FLAG51 y FLAG56 (Fig. 12C).

Estas muestras las transformamos en el plásmido pCR2.1 bajo el gen reportero

lacZ para su posterior identificación. Realizamos una digestión con la enzima EcoRI (Roche) para comprobar el tamaño del inserto y mandamos a secuenciar a STAB VIDA (Caparica, Portugal) 4 de las muestras que tenían el inserto adecuado, 2 de FLAG51 y otras 2 de FLAG56. Los resultados de la secuenciación mostraron distintas delecciones (Fig. 11).

**Figura 11. Representación de las delecciones secuenciadas.** Esquema del *locus Mrf4/Myf5* en el cual la situación de las delecciones obtenidas para *Myf5* se encuentran representadas por flechas azules.



**Figura 12. Geles de la búsqueda de fundadores de las líneas FLAG-Myf5 y Myf5-KO.** (A) Gel de la PCR con cebadores específicos del FLAG, de la primera camada de la microinyección (1-11), un control positivo (+) y un control negativo (-), en el cual el número 2 corresponde a un positivo. (B) Gel de la PCR con cebadores específicos del FLAG, tanto de la primera (2-12) como de la segunda (13-22) camada obtenidas por microinyección, en el cual la única banda que aparece con un tamaño adecuado pertenece al falso positivo que empleamos en este caso como control positivo (+). (C) Gel realizado tras el ensayo con la enzima T7 sobre las muestras de la primera camada de la microinyección del FLAG (2-12), dónde se obtuvieron 3 positivos (3, 5 y 9). Las muestras 5 y 9 se utilizaron para estudiar su delección mientras que la muestra 4 se desechó porque el individuo del que procedía presentaba una malformación.

En el caso de FLAG56, este presentaba una posible delección de 4 pb dentro de la secuencia de *Myf5*, que provoca que la proteína resultante solo mantenga intactos los 4 primeros aminoácidos al compararla con la proteína *Myf5*. Además, de la otra muestra secuenciada para este mismo individuo vimos una delección de 165 pb, de las cuales, solo 7 pertenecen a la secuencia codificante de *Myf5* y el resto forman parte de su promotor mínimo.

De las muestras secuenciadas del FLAG51, pudimos observar por un lado una delección de 9 pb que daría lugar a una proteína que únicamente se diferencia de *Myf5* en 3 aminoácidos, lo cual no nos interesaba, ya que podía no impedirle ejercer su función, pero, por otra parte, obtuvimos una delección del nucleótido 2 al 14 de la secuencia de *Myf5*, en total 13 pb que dan lugar a una proteína truncada.

### 3.2.3. Estudio de las delecciones en la F1

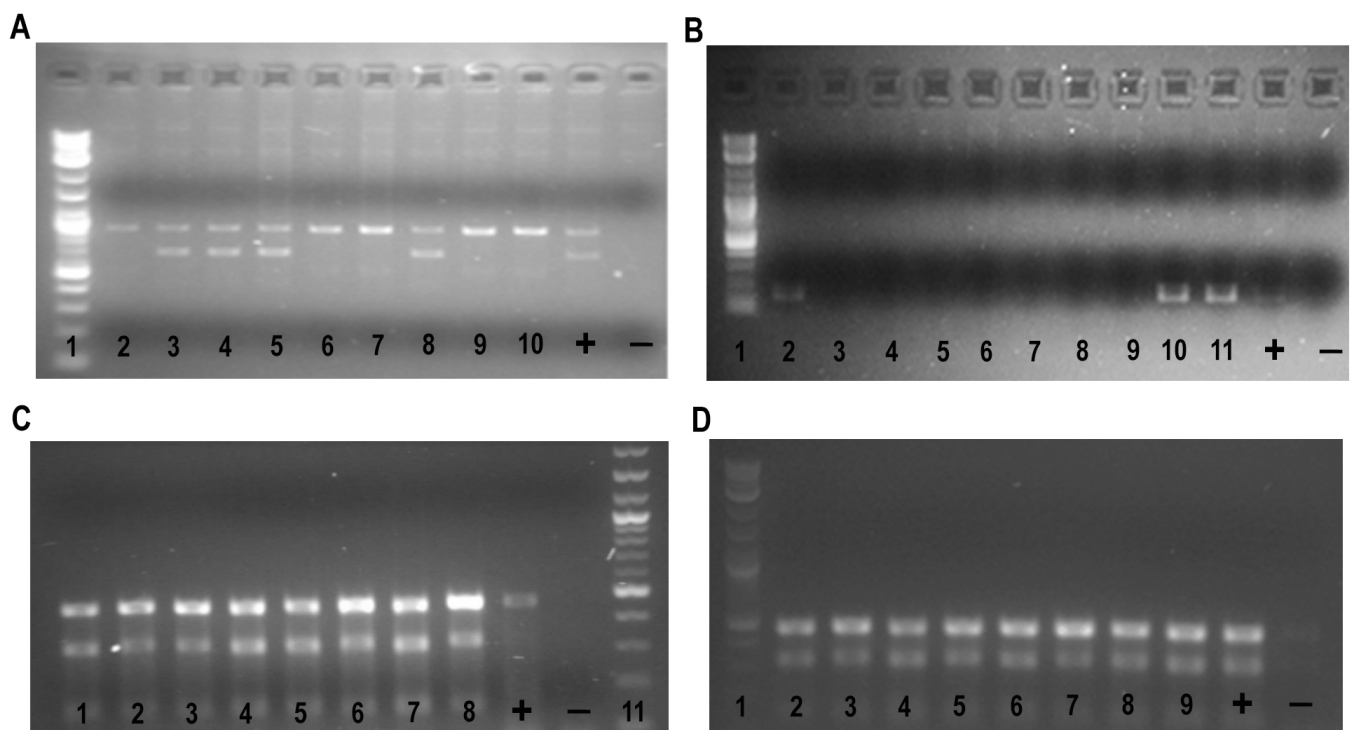
La hembra FLAG56 la pusimos en cruces con un macho silvestre. Después, tomamos biopsias de cada uno de los 9 individuos obtenidos de la F1 y por PCR comprobamos si algunas de las delecciones que vimos tras la secuenciación estaban presentes en alguno de ellos, o incluso si presentaban alguna distinta. De esta manera detectamos 4 posibles muestras con la delección de 165 pb (Fig. 13A), de los cuales mandamos a secuenciar un macho y una hembra.

Los resultados de dicha secuenciación mostraron la misma delección de 165 pb en ambos individuos. Antes de poner ambos animales en cruces para obtener individuos homocigóticos con dicha delección, decidimos mandar a secuenciar otro clon de cada uno de los dos positivos secuenciados para verificar si los SNPs que aparecen son un error de la PCR o

una mutación puntual que se ha insertado en el genoma de dicho animal.

Además, para la delección de 4 pb del FLAG56, llevamos a cabo el estudio de la transmisión a la F1 mediante PCR a partir de los 5 individuos que parecían no tener la delección de 165 pb. Para poder hacerlo, diseñamos cebadores específicos para dicha delección e identificamos 2 muestras en las que había amplificación por PCR con estos cebadores (Fig. 13B), los cuales se mandaron a secuenciar para confirmar la presencia de esta delección de 4 pb. Actualmente estamos esperando los resultados de dicha secuenciación.

En el caso del macho FLAG51 en el que apareció una posible delección de 13 pb, lo pusimos en cruces con 2 hembras silvestres previamente superovuladas. De ellas recolectamos tanto los embriones como las membranas de la F1, de las cuales extrajimos el ADN. Al genotipar dichas muestras comprobamos que la transmisión de una delección se daba en el 100% de los 16 individuos obtenidos de la F1 de este cruce (Fig. 13C-D). Para comprobar cuales de esas delecciones correspondían a la delección de 13 pb que presentaba FLAG51, hemos diseñado cebadores específicos para dicha delección con los que más adelante poder



genotiparlos y mandar a secuenciar.

**Figura 13. Geles de los genotipados de la F1 de las distintas mutaciones Myf5-KO.** (A) Genotipado de la delección de 165 pb de FLAG56. En este gel se observan 4 positivos (3, 4, 5 y 8), los cuales pueden identificarse por la presencia de 2 bandas, una a ~1Kb correspondiente al alelo silvestre y otra ~200 pb más pequeña correspondiente al alelo mutante, al igual que en el control positivo (+). (B) Genotipado de la delección de 4 pb de FLAG56 mediante cebadores específicos. En este gel se observan 3 positivos (2, 10 y 11), los cuales pueden identificarse por la presencia de 1 banda por amplificación del ADN mutado de manera específica por los cebadores utilizados. Esta banda, aunque más tenue, aparece también en el control positivo mutante (+) y no aparece en el control positivo silvestre (-). (C-D) Genotipado de membranas de la F1 de FLAG51 en dónde podemos ver que todas las muestras han dado positivo, por aparición de las 2 mismas bandas que en el control positivo de la mutación (+).

## DISCUSIÓN

Myf5 es un gen clave para la determinación de las células del miotomo en la formación del músculo esquelético, por lo que conocer como está regulado es esencial para comprender por completo el proceso de miogénesis. Mediante un microarray hemos generado una gran cantidad de datos sobre genes que se encuentran diferencialmente expresados en presencia y ausencia de la secuencia reguladora de *Myf5* en las extremidades. Verificar mediante hibridación *in situ* (del inglés, ISH) y PCR cuantitativa los genes que aparecen más afectados en los resultados de nuestro microarray nos permitiría un mayor conocimiento de las interacciones que presenta *Myf5*. Este camino es el que hemos comenzado durante este trabajo con el gen *Pax1*, un factor de transcripción muy importante durante el desarrollo del esqueleto en vertebrados. Mediante PCR cuantitativa

hemos podido cotejar los resultados obtenidos para este gen en el microarray, confirmando así que existe una sobreexpresión del mismo en ausencia del Limb Core Enhancer. Utilizando la técnica de hibridación *in situ*, no logramos distinguir una diferencia de la señal por expresión de *Pax1*, por lo que deberemos realizar más ISH y secciones de embriones para determinar si existe diferencia o no entre ambas líneas, tal como nos indicaron los demás estudios. El uso de concentraciones limitantes de sonda puede, en algunos casos, servir para determinar cambios cuantitativos en la expresión de genes cuyos patrones no cambian significativamente.

Las técnicas que hemos empleado en este trabajo están basadas en transcriptómica, ya que no existen anticuerpos específicos con los que estudiar a la proteína Myf5. Para un estudio más completo de *Myf5* es

necesario un nuevo mutante, que nos permita un seguimiento de la expresión de la proteína. Esto es lo que durante este estudio hemos intentado conseguir con la generación de un mutante FLAG-Myf5 mediante CRISPR/Cas9, el cual expresaría una proteína de fusión a la que podrían unirse anticuerpos específicos para la secuencia del FLAG. Aun así, todavía no hemos logrado encontrar un fundador para dicha mutación, aunque seguirá siendo uno de nuestros objetivos.

Por otro lado, durante la búsqueda de un fundador de la línea FLAG-Myf5, hemos obtenido una serie de pequeñas deleciones que podrían generar líneas Myf5-KO. Esto sería un logro importante con el que poder seguir avanzando en la investigación sobre *Myf5*, ya que actualmente, los mutantes que existen para este gen tienen delecionados a su vez alguna de las secuencias reguladoras que se encuentran presentes en el locus *Mrf4/Myf5* y *alterando la expresión del gen Mrf4*, convirtiéndolos en modelos poco fiable para el estudio de la función de *Myf5*. Actualmente tenemos 3 posibles fundadores para distintas deleciones que podrían dar lugar a una proteína truncada de *Myf5*, con los que esperamos en poco tiempo lograr generar al menos una línea Myf5-KO.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

Con motivo de facilitar la comprensión de los distintos elementos preparados en el laboratorio y que se han utilizado en este estudio, a continuación se describe la composición de cada uno de ellos:

- BBR: 10 g berberina (del inglés, BBR) en 100 ml TBST.

Bromuro de Etidio: Solución stock a 10 mg/ml.

Glicina/PBT: 2 mg de glicina por ml de PBT 1X.

H<sub>2</sub>O DEPC: dietil pirocarbonato en H<sub>2</sub>O miliQ al 0,01% (p/v).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBT: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBT 1X a una concentración final del 6% (v/v).

LB: 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl, a pH 7.

Metanol 100% (v/v)

Metanol 25%/PBT: metanol en PBT 1X a una concentración final del 25% (v/v).

Metanol 50%/PBT: metanol en PBT 1X a una concentración final del 50% (v/v).

Metanol 75%/PBT: metanol en PBT 1X a una concentración final del 75% (v/v).

Mix de hibridación: Formamida al 50% (v/v), tampón salino de citrato de sodio (del inglés, SSC) 5X pH 4,5, 20 mg/ml de dodecilsulfato sódico (del inglés, SDS), BBR al 2% (p/v), 250 µg/ml de tRNA, 0,1 mg/ml de Heparina.



Mix Detergente: Nonidet P40 al 1% (v/v), SDS al 1% (v/v), desoxicolato al 0,55% (p/v), EDTA 50 mM, TBS 1X.

NBT: Nitroazul de tetrazolio (del inglés, NBT) 100 mg/ml al 70% (v/v) en dimetilformamida.

NTMT: NaCl 0,1M, Tris pH 9,5 0,1M, MgCl<sub>2</sub> 0,05M, Tween 20 al 0,01% (v/v).

PBS 1X: 8 g/L de NaCl, 0,2g/L de KCl, 0,2g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,43 g/L de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O) a pH 7,4

PBT 1X: PBS 1X, Tween 20 al 10% (v/v) en una dilución 1:1000.

Reactivo bloqueante: TBS 1X, suero de oveja en una dilución 1:10, BBR en una dilución 1:5.

Solución de lavado para embriones: Nonidet P40 en PBS 1X al 0,2% (v/v).

Solución de tinción: NTMT, 100 µg/ml de BCIP, 150 µg/ml de NBT.

Solución post-fijadora: Para-formaldehído (PFA) al 4% (p/v) en PBS, Glutaraldehído al 0,2% (v/v).

Solución X: Formamida al 50% (v/v), SSC 2X, SDS al 1% (v/v).

SSC 20X: NaCl 3M, citrato trisódico 300 mM.

Tampón TAE: 4,88 g de Tris Base, 19,8 mg de ácido acético glacial, 10 ml EDTA 0,5M.

Tampón de Biopsias 1X: Tris en HCl, pH 8,5, 100 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,2% (v/v), NaCl 200 mM.

Tampón de carga: Glicerol al 30% (v/v), azul de bromofenol al 0,25 % (p/v), xilenocianol al 0,25% (p/v), H<sub>2</sub>O miliQ.

Tampón TE: EDTA 1 mM, Tris en HCl, pH 8,5, 10 mM a un pH final de 7,7

TBS: NaCl 136,9 mM, KCl 5 mM, Tris Base 24,77 mM.

TBST: TBS 1X, Tween 20 al 10% (v/v) en una dilución 1:1000.

## **2. Métodos**

### **2.1. Experimentación Animal**

#### **2.1.1. Superovulación**

A las hembras de las cuales se querían obtener embriones, se les realizó una inyección peritoneal de 5UI (unidades inyectables) de suero de hembra de caballo preñada (PMSG), el cual provoca la maduración de un mayor número de óvulos en el ratón. 46h después, se les hizo una nueva inyección peritoneal de 5UI, esta vez de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), para provocar la liberación de los óvulos. Pasadas 5-6 h de la segunda inyección, se establecieron los cruces con machos y a primera hora de la mañana siguiente se observó la presencia o no de tapón o plug vaginal.

#### **2.1.2. Establecimiento de cruces**

Cada hembra superovulada se introdujo dentro de la jaula de un macho hasta la

observación del plug vaginal, tras lo cual, esta se devolvió a su jaula.

### **2.1.3. Extracción de embriones**

Se sacrificó a la hembra portadora de los embriones por dislocación cervical. Una vez comprobada la muerte del animal, se realizó una incisión en la zona ventral a partir de la cual, se extrajo el útero cortando justo antes de ambos ovarios. Se fijaron los extremos del útero a los de una placa de Petri con PBS 1X por los ovarios con ayuda de dos agujas y, por medio de unas tijeras, se cortó transversalmente la capa más externa del útero. Después, se utilizaron dos pinzas para romper la membrana extraembrionaria y dejarlos salir. Posteriormente, se separó la membrana del resto del embrión. En función del experimento para el que se usaron los embriones, la forma de continuar con la extracción varió.

#### **2.1.3.1. Extracción de embriones para ARN**

Si los embriones se emplearon para extracción de ARN, con ayuda de una pipeta Pasteur (Sigma-Aldrich), a la cual se le cortó la punta previamente para que fuera de mayor calibre, se fueron llevando los embriones uno a uno a otra placa en hielo, dónde se cortaron las extremidades delanteras de cada embrión, que se

fueron guardando en tubos de 1,5 ml con tapón de rosca. Por último, se extrajo el PBS que se hubiera arrastrado al colocar las extremidades en los tubos y se pesaron para así continuar con la extracción de ARN.

#### **2.1.3.2. Extracción de embriones para ISH**

En caso de que los embriones fueran para ISH, los embriones se guardaron en PFA al 4% (p/v), para fijar las muestras, y se conservaron a 4°C.

#### **2.1.3.3. Extracción de embriones para genotipado**

Si el objetivo de la extracción era el genotipado de una línea, los embriones se conservaron en placas de 20 pocillos en solución fijadora Mirsky's (National Diagnostics) a 4°C mientras que las membranas se conservaron en tubos de 1,5 ml a -20°C.

### **2.1.4. Secciones de extremidades de embrión de ratón**

#### **2.1.4.1. Preparación de las muestras**

Se prepararon 20 ml de disoluciones de agarosa de alta electro-endosmosis (Seakem<sup>®</sup> Gold Agarose) al 1% y al 2% (p/v) en PBS 1X y se introdujeron en un baño a 55°C para evitar que solidificara la agarosa. De manera paralela, se cortaron las extremidades delanteras de

embriones de 11,5 dpc Limb11 y silvestre en los que se había realizado ISH. Las extremidades se depositaron durante 40 min primero en la solución de agarosa al 1% (p/v) a 55°C y a continuación durante otros 40 min en la solución de agarosa al 2% (p/v) a 55°C. Pasado ese tiempo, con una pipeta Pasteur se pasaron las extremidades a bloques de vidrio sobre un termobloque a 55°C con exceso de la misma solución de agarosa al 2% (p/v). Los bloques de agarosa se conservaron en solución fijadora Myrsky's (National Diagnostics) a 4°C.

#### **2.1.4.2. Realización de secciones mediante Vibratomo**

Las secciones se realizaron en un vibratomo (Leica VT100S) a un grosor de 75 µm y utilizando PBS 1X a 4-8°C. Las fotografías se obtuvieron con una cámara Kodak K-620x acoplada a un microscopio estereoscópico Leica DMR.

## **2.2. Manipulación de ADN**

### **2.2.1. Extracción de ADN genómico murino a partir de biopsias de oreja**

Se incubó tampón de biopsias (Tail Buffer) 1X a 55°C durante unos 10 min y posteriormente se añadieron 50 µl del mismo a cada muestra. Se dejaron las muestras durante 5 min en un termobloque a 98°C y después se llevaron a incubar en un baño a 55°C durante 10

min. Durante ese tiempo, se preparó un Mix con 50 µl de Tail Buffer 1X y 1µl de Proteinasa K (Roche) a 10ng/µl por cada muestra. Pasados los 10 min, se añadieron 50 µl de Mix en cada muestra y se volvió a incubar a 55°C durante unos 20-40 min, en función de si se había disgregado o no toda la muestra. Después, se incubó a 98°C durante no más de 5 min para inactivar la proteinasa K. Se centrifugó 10 min a 16100 xg y se pasaron 50 µl de sobrenadante a otro tubo de 1,5 ml, al cual se le añadieron 50 µl de isopropanol para precipitar el ADN. Se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 16100 xg, se descartó el sobrenadante y se lavó cada muestra con 500 µl de EtOH al 70% (v/v). Luego, se desechó el etanol y se dejaron secar al aire. Por último, se resuspendieron en 50 µl de tampón TE (pH 7,7).

### **2.2.2. Ligación**

Se mezclaron, en tubos de 200 µl, 5 µl de PCR, 2,5 ng del vector pCR2.1, 1X de tampón de ligación (Roche), 1U de la enzima ligasa (Roche) y H<sub>2</sub>O miliQ hasta un volumen final de 20 µl. A continuación, los tubos se dejaron en incubación a 16°C toda la noche (O/N).

### **2.2.3. Preparación de placas de LB/Ampicilina**

Se calentó una botella de medio LB en un microondas hasta que se encontraba derretido por completo. Después se llevó a un baño a 52°C hasta que se estabilizó. Durante ese tiempo, se desinfectó con EtOH la poyata en la que se realizarían las placas y cuando se secó, se encendió el mechero para establecer condiciones de asepsia. Se midió en una probeta el volumen exacto de LB para añadir 1 parte de Ampicilina (Sigma-Aldrich) 50 mg/ml por cada 1000 partes de LB. Se devolvió a la botella, donde se agitó lentamente para no formar burbujas y se repartió el medio por las distintas placas de Petri. Se dejaron enfriar bajo el mechero para que solidificara el medio y se conservaron a 4°C.

#### **2.2.4. Transformación bacteriana con plásmidos**

Para realizar la transformación se usaron bacterias competentes químicas de *Escherichia coli* DH5α (Servicios Generales del CABD) a las que se les añadió 5 µl de la ligación y se dejó 30 min en hielo.

Luego, se indujo un choque térmico colocando el tubo en un baño a 42°C durante 30 s y se introdujo de nuevo inmediatamente después en hielo durante 3 minutos. A continuación, en condiciones de asepsia, se añadieron 900 µl de SOB (del inglés, *Super Optimal Broth*) (Roche)

y se incubó a 37°C durante 45 minutos bajo agitación. Durante ese tiempo, la placa con medio LB/Ampicilina que iba a ser usada para sembrar las bacterias transformadas, se trató con 40 µl de H<sub>2</sub>O miliQ estéril y 10 µl de IPTG (Roche) a una concentración de 24 mg/ml, además de con 25 µl de medio LB líquido y 25 µl de X-Gal (Calbiochem) a una concentración de 40 mg/ml, para poder distinguir entre las colonias que expresaron LacZ y las que no, y se secaron en un incubador a 37°C. Pasado ese tiempo, se sacaron los tubos del incubador y se centrifugaron a 3000 xg durante 3 min. Después, bajo condiciones de asepsia, se abrieron los tubos y se voltearon para eliminar el exceso de sobrenadante. Con los restos de sobrenadante que permanecían en el tubo (80-100 µl aprox.) se resuspendió el precipitado y se sembró en la placa tratada anteriormente, bajo condiciones de asepsia, con ayuda de un asa de vidrio.

Finalmente, se dejó incubar a 37°C, O/N. Transcurrido ese tiempo, se guardó la placa a 4°C hasta que las colonias azules, aquellas en las que no se produjo el inserto dentro de la secuencia de LacZ, se distinguían mejor de las colonias blancas.

### **2.2.5. Cultivo de las bacterias transformadas**

Las bacterias transformadas se cultivaron en tubo, en 3 ml de medio LB líquido con ampicilina 50mg/ml en una dilución 1:1000, eligiendo para ello las colonias de color blanco, en las cuales el inserto había interrumpido el marco de lectura del gen reportero *LacZ*, localizado a ambos lados del sitio de clonación. Finalmente, los tubos se incubaron a 37°C, O/N.

### **2.2.6. Extracción de ADN plasmídico mediante miniprep**

Se transfirieron, en condiciones de asepsia, 1,5 ml de los cultivos a tubos de 1,5 ml y se centrifugaron 1 min a 16100 xg. A continuación, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 250 µl de la solución de resuspensión P1+ARNasa (ARNasa a 10 µg/µl). Seguidamente, se añadieron 250 µl del tampón de lisis P2, se invirtieron los tubos suavemente y se dejaron 4 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se neutralizó el tampón de lisis con la solución P3, se invirtieron los tubos suavemente de nuevo y se volvieron a centrifugar a 16100 xg durante 10 minutos. Después, se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos de 1,5 ml y se precipitaron los ácidos nucleicos con 560 µl de isopropanol a -20°C durante 10 minutos, tras lo cual se centrifugaron a

4°C durante 10 minutos a 16100 xg y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con EtOH 70% (v/v), se desechó y se dejaron secar los tubos al aire. Luego, se resuspendió en 40 µl de tampón TE, se dejaron los tubos 10 min a 42°C para su completa disolución y se midió la concentración mediante el uso de UV-Vis NanoDrop® One/One<sup>c</sup> (Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras se conservaron a -20°C.

### **2.2.7. Aislamiento del plásmido mediante maxiprep**

Los inóculos para la maxiprep se realizaron en un matraz de 1 L de capacidad al cual se añadieron, en condiciones de asepsia, 250 ml de medio LB líquido y ampicilina 50 mg/ml en una dilución 1:1000. Seguidamente se añadieron aproximadamente 0,7 ml de cultivo y se incubó O/N a 37°C.

La maxiprep se llevó a cabo mediante el kit Nucleo Bond® (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. De ese modo, se centrifugaron los 250 ml del cultivo a 6000 xg y 4°C durante 15 min. Luego, se resuspendió en 8 ml de tampón RES e inmediatamente después se añadieron 8 ml de tampón LIS. Se agitó suavemente para evitar que pudieran romperse las células y liberar así el ADN genómico y se dejó reposar a temperatura ambiente durante menos de

5 min, antes de que se neutralizara con 8ml del tampón NEU, para evitar que la lisis fuera completa, y así obtener en el medio solo el ADN plasmídico. A continuación, se centrifugó a 9300 xg y 4°C durante 25 min y se añadió el sobrenadante en la columna del kit, previamente equilibrada con 12 ml de tampón EQU. Se desechó el líquido que salió por la columna y se lavó con 8 ml del tampón WASH. Después se añadieron a la columna 5 ml del tampón ELU para recuperar el ADN de la columna y fueron recogidos en tubos de vidrio, al cual se le añadieron 3,5 ml de isopropanol para provocar la precipitación de los ácidos nucleicos, se mezcló por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Se centrifugó a 15000 xg y 4°C durante 30 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 2 ml de EtOH al 70% (v/v), que se descartó y se dejó secar al aire. Finalmente, se resuspendió durante 2 h en 500 µl de tampón TE bajo agitación y se pasó el contenido del tubo a otro tubo de 1,5 ml. La concentración se midió mediante UV-Vis NanoDrop® One/One<sup>c</sup> (Thermo Scientific). Las muestras se conservaron a -20°C.

#### **2.2.8. Digestión de plásmidos**

Para comprobar si en la muestra se encontraba el inserto, se realizó una

digestión de aproximadamente unos 400 ng de ADN con 10U de una enzima de restricción y su correspondiente tampón, para que este se encontrara a una concentración de 10X, con H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de aproximadamente 50 µl, a 37°C durante 1 h.

#### **2.2.9. Extracción de ADN con Fenol: Cloroformo (Phe:Chl)**

Se añadieron 50 µl de Phe:Chl (AppliChem Panreac) a las muestras (relación 1:1) para generar una división de la muestra en dos fases, de manera que el ADN se encontraba en la fase superior, y se mezclaron por vórtex. Se centrifugaron a 16100 xg durante 5 min. Seguidamente, se transfirió la fase superior, dónde se encontraban los ácidos nucleicos, a otros tubos de 1,5 ml con tapones de rosca y se añadieron a la fase inferior 50 µl de tampón TE para lavar. Se volvió a mezclar por vórtex y se centrifugó a 16100 xg durante 5 min para incrementar la eficiencia del método. Nuevamente, se transfirió la fase superior a los tubos dónde se había recogido anteriormente la misma, obteniendo un volumen aproximado de 100 µl. A continuación, se añadieron 100 µl de cloroformo, se mezcló con vórtex y se centrifugó a 16100 xg durante 3 minutos. Pasado ese tiempo, se transfirió la fase superior a un tercer tubo de 1,5 ml y se

añadieron 100 µl de tampón TE a la fase inferior para lavar. Se mezcló de nuevo por vórtex y se centrifugó a 16100 xg durante 3 min para, una vez más, incrementar la eficiencia del método, tras lo cual se transfirió la fase superior a los tubos dónde se recogieron anteriormente, obteniendo así un volumen final aproximado de 200 µl. Para precipitar los ácidos nucleicos se añadieron 20 µl de NaAc 3M y 500 µl de EtOH 100% (v/v), se mezclaron por vórtex y se dejaron a -80°C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron a 16100 xg durante 30 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. Los ácidos nucleicos precipitados se lavaron con EtOH 70% (v/v), que se desechó y se dejaron secar al aire. Finalmente, se resuspendieron las muestras en 40 µl de tampón TE.

## **2.2.10. Búsqueda de indels mediante ensayo con T7**

### **2.2.10.1. Amplificación de la región de interés**

Para ello, se realizó una PCR externa (-579F/+273R) a partir de ADN extraído de biopsias de una F0 de Flag-Myf5.

#### **2.2.10.2. Ensayo con T7**

A 10 µl de PCR se añadieron 7,5 µl de H<sub>2</sub>O y 1X de tampón NE 2 (New England BioLabs) y se le realizó un gradiente de temperatura siguiendo las siguientes

condiciones; 10 min a 94°C, 1 min a 85°C, 1 min a 75°C, 1 min a 65°C, 1 min a 55°C, 1 min a 45°C, 1 min a 35°C y finalmente 1 min a 25°C. Posteriormente, se añadieron 0,5 µl de una dilución 1:2 de la enzima T7 (Servicio de Proteómica del CABD) en tampón NE 2 y se incubó en un baño a 37°C durante 30 min. En aquellas muestras en las que se observaron bandas que no aparecían en la muestra silvestre, se realizó una ligación, para su posterior transformación y secuenciación.

## **2.2.11. Secuenciación**

Para aquellos plásmidos para los que se requería secuenciación de los insertos, se mandaron a la empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal) 7 µl de miniprep (1,5 µg aprox.) junto con 3 µl del oligo T7, en tubos de 1,5 ml sellados con parafilm.

## **2.3. PCR**

### **2.3.1. Electroforesis**

Los fragmentos de ADN generados por PCR se separaron para su visualización mediante una electroforesis de gel de agarosa de baja electro-endosmosis (Labotaq A.A.) al 2% (p/v) disuelta en tampón TAE 1X.

Los fragmentos de ADN generados por digestión a partir de constructos clonados en plásmidos bacterianos se separaron para su visualización mediante una electroforesis de gel de agarosa de baja

electro-endosmosis (Labotaq A.A.) al 1% (p/v) disuelta en tampón TAE 1X.

### **2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las PCRs se llevaron a cabo para 50-70 ng de ADN con 0,25U de la enzima Taq Polimerasa (Sigma-Aldrich) en 20 µl de volumen final en la cual sus reactivos se encontraban a una concentración final 1X de tampón de PCR (Sigma-Aldrich), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), 100 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) y 0,5 µM de cada cebador. Estas condiciones fueron las empleadas para todas las PCRs realizadas durante este estudio.

Dicha preparación se realizó sobre placas de PCR libres de ADN, DNAsa, RNAsa e inhibidores de la PCR (SARSTEDT) las cuales se sellaron mediante un sellador (MicroSeal) y se llevaron a un termociclador (TPersonal Biometra, Personal Cycler Biometra, Unoll Biometra o Mastercycler Gradient Eppendorf) a distintas condiciones. Todos los programas de PCR usados durante este estudio se realizaron con una fase de desnaturalización de 5 min a 95°C y una fase de extensión final de 5 min a 72°C, salvo que se indique lo contrario.

### **2.3.3. Genotipado de líneas de ratón**

#### **2.3.3.1. Genotipado de la línea Limb11**

Para el genotipado de la línea Limb11 se emplearon el cebador forward 5'- GAA GAC CAC CTT CTC CTA ACA GAG T-3' (Limb enh F) y el cebador reverse: 5'- GGG CTC GAG CAA TAT AAT GTC A-3' (Limb enh R). En esta ocasión se utilizó la enzima Taq Polimerasa del Servicio de Proteómica del CABD. El programa de PCR contenía una desnaturalización de 3 min a 95°C y 32 ciclos de amplificación que constaban de una fase de desnaturalización de 30 s a 95°C, una fase de alineamiento de 45 s a 55°C y una fase de extensión de 1 min a 72°C.

#### **2.3.3.2. Búsqueda de nuevos alelos en F0 generados por CRISPR/Cas9**

##### **2.3.3.2.1 Búsqueda de fundadores FLAG-Myf5**

Para la búsqueda de un fundador de la línea Flag-Myf5 se realizó una PCR para la que se usaron el cebador forward 5'- CAA TCT TTT GGT AAA GTT CAT GAA-3' (-579F) y el cebador reverse: 5'-TTC TTC AGG CGT CTA CGC TCG CG-3' (+293R), a la cual se denominó PCR externa, por ser los cebadores más alejados a Myf5 que se utilizaron. Se realizaron 30 ciclos de amplificación que constaban de una fase de desnaturalización de 30 s a 95°C, una fase de alineamiento de 30 s a 60°C y una fase de extensión de 1 min a 72°C. Posteriormente se llevó a cabo una PCR



en la que se emplearon cebadores específicos del FLAG; el cebador forward 5'-ATG GAC TAC AAA GAC CAT GA-3' (FLAG F) y el cebador reverse 5'-CTT GTC ATC GTC ATC CTT GT-3' (FLAG R) y se realizaron 30 ciclos de amplificación que constaban de una fase de desnaturalización de 30 s a 95°C, una fase de alineamiento de 30 s a 60°C y una fase de extensión de 30 s a 72°C. Para la muestra cuyo ADN fue amplificado correctamente por estos cebadores específicos se realizó una ligación, transformación y secuenciación.

#### **2.3.3.2.2 Búsqueda de fundadores Myf5-KO**

Para la búsqueda de fundadores de las líneas Myf5-KO, se realizó una PCR anidada en la que en primer lugar se hizo una externa (-579F/+293R). A continuación se usaron unos cebadores más cercanos a la secuencia FLAG-Myf5 siendo estos el cebador forward 5'-AGG GAG GGG AGC AGA GCA CTA GAA GAA AGA CAA GAG GCT-3' (-295F) y el cebador reverse 5'-CCT CAT CGT CTG AGC CCT GC -3' (+157R), a la cual se denominó PCR interna, por ser en la que se usaron los cebadores no específicos más cercanos a Myf5 de este estudio, y se realizaron 30 ciclos de amplificación que constaban de una fase de desnaturalización de 30 s a 95°C, una

fase de alineamiento de 30 s a 62°C y una fase de extensión de 45 s a 72°C.

#### **2.3.3.3. Genotipado de la línea FLAG-Myf5**

Para el genotipado de la línea Flag-Myf5 se realizaron dos PCRs a partir del producto de una PCR externa (-579F/+293R), en la que se usaron por un lado los cebadores FLAG F y +157R y por otro los cebadores -295F y FLAG R. Dichas PCRs se realizaron a las mismas condiciones que la PCR específica de búsqueda de fundadores de la línea FLAG-Myf5 (FLAG F/FLAG R).

Paralelamente, el genotipado de esta línea se realizó mediante una PCR interna (-295F/+157R) en la que al tratarse de ratones heterocigóticos los positivos debían presentar 2 bandas, una del alelo silvestre y otra del alelo con el FLAG, este último, 69 pb mayor.

#### **2.3.3.4. Genotipado de las líneas Myf5-KO**

Para el genotipado de las líneas Myf5-KO se emplearon distintos cebadores en función de la delección presentada.

En el caso de la delección de FLAG56 de 4 pb, se realizó una PCR en la que se emplearon dos cebadores forward específicos distintos; uno para la secuencia mutante, 5'-AGG ATG GAC ATG ACG GCT GC-3' (Myf5\_KO\_F), y

otro para la secuencia silvestre, 5'-AGG ATG GAC ATG ACG GAC GG-3' (Myf5\_WT\_F), y el cebador reverse +157R. En el caso de la PCR Myf5\_KO\_F/+157R, se realizaron 28 ciclos de amplificación que constaban de una fase de desnaturalización de 30 s a 95°C, una fase de alineamiento de 30 s a 69°C y una fase de extensión de 15 s a 72°C. Para la PCR Myf5\_WT\_F/+157R, en cambio, el programa de PCR contenía 28 ciclos de amplificación que constaban de una fase de desnaturalización de 30 s a 95°C, una fase de alineamiento de 30 s a 62°C y una fase de extensión de 20 s a 72°C.

El genotipado de la delección de FLAG56 de 165 pb se realizó por PCR externa (-579F/+293R). Las muestras que presentaban una banda 165 pb menor que la observada la muestra silvestre se usó para realizar una ligación, transformación y posterior secuenciación.

### **2.3.4. PCR cuantitativa (qPCR)**

#### **2.3.4.1. Síntesis de ADNc**

La síntesis de ADNc se realizó utilizando el kit "First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)" de Roche (los volúmenes que se indican a continuación vienen referidos a los reactivos que contiene el kit). Así pues, se mezclaron 1 µg de ARN desnaturalizado durante 15 min a 65°C con 2 µl del tampón de PCR, 4 µl de

MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de dNTPs, 2 µl de cebadores aleatorios, 1 µl de un inhibidor de ARNasas y 0,8 µl de transcriptasa inversa AMV y H<sub>2</sub>O DEPC hasta un volumen final de 20 µl. Posteriormente, la reacción se incubó a 25°C durante 10 min para que los cebadores se anillaran al ARN molde y a continuación a 42°C durante 1 h para que actuara la transcriptasa. Finalmente, se desnaturalizó la transcriptasa incubando primero 5 min a 99°C y después 5 min a 4°C. Las muestras se conservaron a -20°C.

#### **2.3.4.2. Comprobación del ADNc**

Se prepararon distintas diluciones de ADNc en H<sub>2</sub>O miliQ (1:5, 1:10; 1:40). Para probar dichas diluciones se realizaron PCRs con cada una de las parejas de cebadores que se emplearon en la qPCR; una PCR con cebadores de la actina, siendo estos el cebador forward 5'-GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG-3' (RT\_ActB\_F) y el cebador reverse 5'-CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG-3' (RT\_ActB\_R) y una PCR con cebadores específicos para la secuencia de *Pax1*; el cebador forward 5'-GGC CAT ACG AAG CAA GTA AGC-3' (qPCR\_Pax1 F) y el cebador reverse 5'-CCA TGA ACG CGG GAT ACT GA-3' (qPCR\_Pax1 R). En esta ocasión, en ambas PCRs se realizaron 39 ciclos de amplificación que constaban de una fase de desnaturalización de 15 s a

95°C y una fase de alineamiento de 45 s a 60°C.

#### **2.3.4.3. qPCR**

En campana de flujo, a cada pocillo de la placa de PCR de 96 pocillos (gTPbio) se le añadió 4 µl de un Mix compuesto por una de las parejas de cebadores y H<sub>2</sub>O miliQ estéril a una concentración final de 500 Nm, 10 ng de ADNc y 5U de SYBR Green (Roche). Se selló la placa, se centrifugó 30 s y se llevó al termociclador (Bio-Rad CFX Connect Real-Time System), a las mismas condiciones que la PCR de comprobación del ADNc.

### **2.4. Manipulación de ARN**

#### **2.4.1. Muestras para Microarray**

##### **2.4.1.1. Extracción de ARN**

El ARN total se extrajo de las extremidades delanteras de embriones de 11,5 dpc usando el *Tri Pure Isolation Reagent* (Sigma-Aldrich) según las instrucciones del fabricante. Por ello, se usó un volumen de 1 ml para muestras de entre 50-100 mg de peso de las muestras de las que se iba a extraer el ARN, y 0,8 ml para muestras de menos de 10 mg de peso, junto con 8 µg de glicógeno, en tubos de 1,5 ml con tapón de rosca. Con jeringas estériles de 1ml (BD Plastipak), se hicieron pasar las muestras por agujas (Aganin Needle Teruno®) con un calibre de 0,5 mm de diámetro, para

que estas se disgregaran hasta su completa homogenización. Posteriormente, se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 min para la correcta disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 2 µl de cloroformo por cada ml de *Tri Pure Isolation Reagent* utilizado anteriormente y se mezclaron por vórtex de 15 s, tras lo cual se incubaron durante 8 min a temperatura ambiente. Después se centrifugaron los tubos a 4°C y 12000 xg durante 15 min, obteniendo tres fases diferenciadas en las muestras y se transfirió a otros tubos de 1,5 ml con tapón de rosca la fracción transparente superior, que es la que contenía el ARN. A continuación, se precipitó el ARN con 0,5 ml de isopropanol por cada ml usado de *Tri Pure Isolation Reagent*, y se mezcló invirtiendo los tubos varias veces. Se incubaron a temperatura ambiente durante 7 min y, pasado ese tiempo, se centrifugaron a 12000 xg y 4°C durante 10 min, tras lo cual, se eliminó el sobrenadante. Las muestras se lavaron con 1 ml de EtOH 70% (v/v) por cada ml de *Tri Pure Isolation Reagent* usado y se mezclaron por vórtex hasta despegar el precipitado de ARN. Después, se centrifugaron a 4°C durante 5 min a 7600 xg, se desechó el sobrenadante y se dejaron secar al aire. Por último, las muestras se resuspendieron en 0,5 ml de

H<sub>2</sub>O DEPC y se añadieron 40U de ARNsin (Promega) para evitar que actuaran las ARNasas. Para la disolución completa del ARN, las muestras se incubaron a 57°C durante 12 min, tras lo cual se midió la concentración de ARN mediante el uso de UV-Vis NanoDrop® One/One<sup>c</sup> (Thermo Scientific). Las muestras se conservaron a -80°C.

#### **2.4.1.2. Tratamiento con DNAsas**

Antes de mandar las muestras para la realización del microarray, se trataron 10 µg del ARN extraído con 2U de DNasa I libre de RNasa (New England BioLabs) en presencia del tampón de DNAsas (New England BioLabs) a una concentración final del 1X, y H<sub>2</sub>O DEPC hasta un volumen final de 25 µl y se incubó 10 min a 37°C. Finalmente, se conservaron a -80°C hasta el momento de su uso.

#### **2.4.1.3. Purificación del ARN**

El ARN extraído se purificó con ayuda del kit RNeasy® (QUIAGEN) según las instrucciones del fabricante. Por ello, se ajustó el volumen de los tubos a 100 µl con H<sub>2</sub>O DEPC y se le añadieron 350 µl del tampón RLT y 250 µl de EtOH 100% (v/v) mezclando correctamente, se transfirió todo el contenido del tubo a la columna del kit y se centrifugó a 16100 xg durante 15 s. Después se añadieron 500 µl de tampón RPE a la columna y se

centrifugó de nuevo a 16100 xg durante 15 s. Se volvió a añadir a la columna 500 µl de tampón RPE y se centrifugó a 16100 xg durante 2 min. Se centrifugó una vez más a 16100 xg durante 1 min para asegurar que en la columna no quedaron restos de tampón RPE y se añadieron 30 µl de H<sub>2</sub>O DEPC. A continuación, se centrifugó a 16100 xg durante 1 min para recoger el ARN purificado. Para terminar, se determinó la concentración y los parámetros de pureza mediante el uso de UV-Vis NanoDrop® One/One<sup>c</sup> (Thermo Scientific). Los tubos se conservaron a -80°C hasta el envío a la unidad de genómica del centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (Cabimer) en hielo seco cumpliendo sus condiciones de concentración (mayor a 40 ng/µl) y de cantidad de ARN total (mayor a 250 ng).

#### **2.4.2. Síntesis de sondas de ARN**

A partir de 10-15 µg de ADN digerido, se realizó una extracción de ADN con Phe:Chl y se resuspendió en 10 µl de H<sub>2</sub>O DEPC.

Las sondas de ARN se sintetizaron a partir de 1 µg de ADN lineal, al cual se le añadieron 40U de ARNsin (Promega), 1X de tampón de transcripción (Roche), 1X de digoxigenina (Roche), 20U de T7 Polimerasa (Roche) y H<sub>2</sub>O DEPC hasta un volumen final de 20 µl, y se incubó a

37°C durante 2 h. Pasado ese tiempo, se degradó el ADN con 2U de DNasa libre de RNasa a 37°C durante 15 min. A continuación, se añadieron 76 µl de H<sub>2</sub>O DEPC, 4 µl de EDTA 0,5M para inactivar la DNasa, 5 µg de glicógeno, y 10 µl de NaAc 3M y 250 µl de EtOH 100% (v/v) para precipitar la sonda, y se incubó a -80°C durante 1 h 20 min. Una vez transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 16100 xg y 4°C durante 30 min y se descartó el sobrenadante. El ARN precipitado se lavó con 500 µl de EtOH 70% (v/v), que se desechó y se dejó secar al aire. La muestra se resuspendió en 100 µl de H<sub>2</sub>O DEPC y se añadieron 40U de ARNsin para evitar que se degradase la sonda. La concentración de las sondas se determinó mediante UV-Vis NanoDrop<sup>®</sup> One/One<sup>c</sup> (Thermo Scientific). Para verificar la correcta síntesis de la sonda, se desnaturalizaron 5 µl de la misma a 65°C durante 5 min y se comprobó mediante electroforesis. Las sondas se conservaron a -20°C.

#### **2.4.3. Hibridación *In Situ***

Antes de empezar con la ISH, se practicaron con una aguja una serie de punciones en la cabeza, corazón y vesícula ótica para evitar que pudieran acumularse las sondas, produciendo así una falsa señal. La ISH se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo de 4 días.

En el día 1, se hicieron lavados de 5 min en el siguiente orden; PBT 1X, PBT 1X, MetOH/PBT 50% (v/v), MetOH 100% (v/v), MetOH 100% (v/v), MetOH/PBT 75% (v/v), MetOH/PBT 50% (v/v), MetOH/PBT 25% (v/v), PBT 1X y de PBT 1X. Seguidamente se procedió a realizar un blanqueamiento por medio de 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBT 6% (v/v) durante 1h seguido de 3 lavados de 5 min con PBT 1X. A continuación, se le realizó un tratamiento con proteinasa K a 10 µg/ml durante 25 min, se incubó con glicina/PBT 2 mg/ml a temperatura ambiente durante 5 min y se lavó 2 veces con PBT 1X durante 5 min cada lavado. Después se realizó una post-fijación con 2 ml de glutaraldehído/PFA 4% (p/v) al 0,2% (v/v) durante 20 min tras la cual se hicieron 2 lavados con PBT 1X de 5 min cada uno. Posteriormente se llevó a cabo una pre-hibridación en 1,5 ml de Mix de hibridación a 70°C durante 1h. Durante ese tiempo, se desnaturalizaron 300-500 ng de la sonda de ARN y se añadieron sobre 200 µl de Mix de hibridación a 70°C, que, pasada la hora de pre-hibridación, se añadieron al embrión. Los tubos se sellaron con parafilm y se dejaron incubar toda la noche a 70°C.

El día 2, se realizaron 3 lavados de con la Solución X y otros 3 con la solución de lavado durante 30 min a 70°C cada uno y 3 lavados más con TBST durante 5 min a

temperatura ambiente. A continuación, se realizó un blanqueamiento durante 2,5 h a temperatura ambiente con reactivo bloqueante (del inglés, Blocking Reagent). Pasado ese tiempo, se añadió el anti-DIG FAB/Blocking Reagent (1/2000) y se incubó a 4°C toda la noche.

En el día 3, se hicieron 5 lavados de 1h a temperatura ambiente con TBST y un sexto lavado con TBST a 4°C y en oscuridad durante toda la noche.

El día 4, se transfirió cada embrión a un pocillo de una placa, y se cubrieron con 2 ml de la solución de tinción NTMT/BCIP/NBT, que provoca que por medio de una reacción química se forme un producto coloreado con la fosfatasa alcalina que lleva conjugada el anticuerpo, y se dejó en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad. Dicha reacción se detuvo con 3 lavados de 5 min en TBST. Por último, se lavaron con PBS 1X y se fijaron con la solución fijadora Mirsky's. Las fotografías se tomaron con una cámara JVZ 3-CCD KY-F55B COLOR VIDEO CAMARA acoplada a un microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500.

## **2.5. Bioinformática**

### **2.5.1. Selección de genes del microarray**

Para elegir los genes del microarray más diferencialmente expresados, se filtraron

los resultados de manera que se seleccionaron únicamente aquellos con valores de fold change mayores a 1,5 o menores a -1,5. A su vez, para elegir aquellos genes estadísticamente más significativos, se escogieron aquellos con un p-value menor a 0,5.

### **2.5.2. Base de datos STRING**

Para conocer las interacciones que existían entre los genes seleccionados en el microarray, se introdujeron en la base de datos STRING. Desde el apartado "Search", se seleccionó el apartado "Multiple proteins", en el cual se introdujeron los genes seleccionados anteriormente en "List of Names" uno debajo del otro. Además de los genes seleccionados en el microarray, también se incluyeron en dicha lista los genes *Myf5*, *Mrf4*, *MyoG* y *MyoD*, los 4 Factores de Regulación Miogénica, para conocer cuáles de los genes seleccionados del microarray se encontraban más estrechamente relacionados con los mismos. Posteriormente se eligió el organismo *Mus musculus*, del cual procedían las muestras del microarray, y se inició la búsqueda.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Dar las gracias por estos 10 meses a todos los integrantes del laboratorio 211 del CABD; Paula Martínez, Jorge Corbacho, Manuel Munuera y sobre todo

a Cristina Vicente y Macarena López, por enseñarme casi desde cero cada una de las técnicas que he utilizado para la elaboración de este trabajo y a Jaime Carvajal por darme la oportunidad de pertenecer a este magnífico grupo haciéndome responsable de una de las líneas de investigación de su laboratorio.

## REFERENCIAS

- Alvarado, D. M., McCall, K., Hecht, J. T., Dobbs, M. B. and Gurnett, C. A.** (2016). Deletions of 5' HOXC genes are associated with lower extremity malformations, including clubfoot and vertical talus. *J. Med. Genet.* **53**, 250–255.
- Arnold, H. H. and Braun, T.** (2000). Genetics of muscle determination and development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **48**, 129–64.
- Biressi, S., Tagliafico, E., Lamorte, G., Monteverde, S., Tenedini, E., Roncaglia, E., Ferrari, S., Ferrari, S., Cusella-De Angelis, M. G., Tajbakhsh, S., et al.** (2007). Intrinsic phenotypic diversity of embryonic and fetal myoblasts is revealed by genome-wide gene expression analysis on purified cells. *Dev. Biol.* **304**, 633–651.
- Blake, J. A. and Ziman, M. R.** (2014). Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development* **141**,.
- Buchberger, A., Freitag, D. and Arnold, H.-H.** (2007). A homeo-paired domain-binding motif directs Myf5 expression in progenitor cells of limb muscle. *Development* **134**, 1171–80.
- Buckingham, M. and Rigby, P. W. J.** (2014). Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis. *Dev. Cell* **28**, 225–238.
- Carvajal, J. J. and Rigby, P. W. J.** (2010). Regulation of gene expression in vertebrate skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* **316**, 3014–3018.
- Carvajal, J. J., Cox, D., Summerbell, D. and Rigby, P. W.** (2001). A BAC transgenic analysis of the Mrf4/Myf5 locus reveals interdigitated elements that control activation and maintenance of gene expression during muscle development. *Development* **128**, 1857–68.
- Carvajal, J. J., Keith, A. and Rigby, P. W. J.** (2008). Global transcriptional regulation of the locus encoding the skeletal muscle determination genes Mrf4 and Myf5. *Genes Dev.* **22**, 265–276.
- Charrasse, S., Causeret, M., Comunale, F., Bonet-Kerrache, A. and Gauthier-Rouvière, C.** (2003). Rho GTPases and cadherin-based cell

adhesion in skeletal muscle development. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **24**, 309–13.

**Cossu, G. and Borello, U.** (1999). Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J.* **18**, 6867–6872.

**Gilbert, S.** (2003). *Developmental Biology*. 7th ed. (ed. Sinauer Associates).

**Hadchouel, J., Carvajal, J. J., Daubas, P., Bajard, L., Chang, T., Rocancourt, D., Cox, D., Summerbell, D., Tajbakhsh, S., Rigby, P. W. J., et al.** (2003). Analysis of a key regulatory region upstream of the Myf5 gene reveals multiple phases of myogenesis, orchestrated at each site by a combination of elements dispersed throughout the locus. *Development* **130**,.

**Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R.** (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio/Technology* **11**, 1026–1030.

**Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Pat Cerretti, D., Urdal, D. L. and Conlon, P. J.** (1988). A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Bio/Technology* **6**,

1204–1210.

**Jensen, E.** (2014). Technical Review: *In Situ* Hybridization. *Anat. Rec.* **297**, 1349–1353.

**Kassar-Duchossoy, L., Giaccone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomès, D. and Tajbakhsh, S.** (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* **19**, 1426–1431.

**King, M., Arnold, J. S., Shanske, A. and Morrow, B. E.** (2006). T-genes and limb bud development. *Am. J. Med. Genet. Part A* **140**, 1407–1413.

**Moncaut, N., Rigby, P. W. J. and Carvajal, J. J.** (2013). Dial M(RF) for myogenesis. *FEBS J.* **280**, 3980–3990.

**Ott, M.-O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H. and Buckingham, M.** (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* **111**, 1097–1107.

**Rudnicki, M. A. and Williams, B. O.** (2015). Wnt Signaling in Bone and Muscle. *Bone* **80**, 60.

**Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C. and Doudna, J. A.** (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* **507**, 62–67.



**Summerbell, D., Ashby, P. R., Coutelle, O., Cox, D., Yee, S. and Rigby, P.**

**W.** (2000). The expression of Myf5 in the developing mouse embryo is controlled by discrete and dispersed enhancers specific for particular populations of skeletal muscle precursors. *Development* **127**, 3745–57.

**Tajbakhsh, S., Rocancourt, D. and**

**Buckingham, M.** (1996). Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature* **384**, 266–270.

**Wolpert, L.** (1992). Gastrulation and the evolution of development. *Dev. Suppl.* 7–13.

**Wu, D. and Rastinejad, F.** (2017).

Structural characterization of mammalian bHLH-PAS transcription factors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **43**, 1–9.